



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 454**

51 Int. Cl.:
C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01946010 .4**

96 Fecha de presentación : **30.05.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1311679**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

54 Título: **Método de inhibición de PAP1 inducido por IL-22.**

30 Prioridad: **24.08.2000 WO PCT/US00/23328**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Aggarwal, Sudepta;**
Foster, Jessica, S.;
Goddard, Audrey;
Gurney, Austin, L.;
Maruoka, Ellen, M.;
Wood, William, I. y
Xie, Ming-Hong

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 316 454 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de inhibición de PAPI inducido por IL-22.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a interleuquina-22 (IL-22) y a métodos de tratamiento de trastornos pancreáticos.

10 **Antecedentes de la invención**

El páncreas es una gran glándula situada detrás del estómago y cerca del duodeno. Secreta enzimas digestivos que entran en el intestino delgado a través de un conducto. Estos enzimas facilitan la digestión de proteínas, grasas y carbohidratos. Además de las enzimas digestivas, el páncreas también libera insulina y glucagón, que juegan un papel importante en el metabolismo de los azúcares.

La pancreatitis es una enfermedad en la cual el páncreas se inflama. El daño en el páncreas tiene lugar cuando se activan las enzimas digestivas y comienzan a atacar la glándula. En casos graves, puede haber hemorragia dentro de la glándula, daño de tejido, infección y formación de quistes. Hay dos formas de pancreatitis. Una forma aguda que aparece repentinamente y puede ser mortal. Una forma crónica de pancreatitis puede surgir si el paciente persiste en beber alcohol, lo cual provoca la reducción de la función pancreática y dolor agudo y pérdida de peso. Existen aproximadamente de 50.000 a 80.000 casos de pancreatitis aguda en los Estados Unidos cada año. Es más común en hombres que en mujeres.

Actualmente, el diagnóstico de la pancreatitis es difícil. Normalmente, las pruebas de función pancreática ayudan al médico a determinar si se están fabricando suficientes enzimas pancreáticas. El rastreo ("scan") CAT puede determinar si existen anomalías en la propia glándula, tales como cálculos biliares, que se asocian frecuentemente con este trastorno. Dado que la pancreatitis crónica es un factor de riesgo importante para el cáncer de páncreas, debería tratarse tan pronto como se realiza el diagnóstico.

El páncreas está comprendido aproximadamente de un 80% de células acinares, un 1%-2% de células islote y un 10%-15% de células ductales cuboidales. El carcinoma de células acinares representa el 1%-2% del carcinoma pancreático, con un 10%-15% adicional de carcinoma pancreático comprendido de células acinares y otros tipos de células [Nomura *et al.*, *Ultra. Path.* (1992) 16:317-329]. Todas las causas de pancreatitis aguda afectan a las células acinares de un modo que da lugar a la activación y la retención de las enzimas digestivas, que dañan la célula acinar y causan la liberación de citoquinas. Las citoquinas atraen células inflamatorias, especialmente neutrófilos, conduciendo a la secreción adicional de citoquinas. Se propone que las moléculas inflamatorias liberadas inducen a un edema pancreático, y necrosis local. Ciertos estudios han sugerido que los inhibidores de citoquinas pueden mejorar la evolución de la pancreatitis en situaciones clínicas específicas.

La interleuquina-22 (IL-22) es una citoquina recientemente identificada producida por células T activadas y está relacionada con la interleuquina-10 (IL-10). IL-22 señala a través de un complejo receptor que comprende CRF2-4, también conocido como IL-10R β , y un nuevo miembro de la familia de receptores de citoquinas de clase II, receptor de interleuquina-22 (IL-22R) [Xie *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 31335-31339]. De los miembros de este complejo receptor, IL-10R β se expresa en diversos tejidos mientras que la expresión de IL-22R está bastante restringida, con una expresión elevada en el páncreas, sugiriendo que IL-22R controla el sitio de acción de IL-22. Como ejemplo, la IL-22 murina induce cambios en la expresión génica en células acinares pancreáticas de diversos genes incluyendo la proteína asociada a la pancreatitis (PAP1), un gen sobreexpresado en la pancreatitis aguda [Iovanna *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1991) 266, 24664-24669]. La señalización de IL-22 a través de un complejo receptor que se expresa altamente en el páncreas, sugiere que IL-22 puede modular una respuesta inmune/inflamatoria en el páncreas, y puede implicarse en enfermedades del páncreas incluyendo la pancreatitis.

IL-22 se describe en WO 00/24758 y Dumontier *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164: 1814-1819.

55 **Descripción resumida de la invención**

La presente invención se refiere a usos, tal y como se define en las reivindicaciones, de antagonistas de anticuerpo de polipéptido de IL-22.

En una realización adicional, tal y como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un método de identificación de antagonistas a un polipéptido IL-22 que comprende poner en contacto el polipéptido IL-22 con una molécula candidata y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido IL-22. Preferiblemente, el polipéptido IL-22 es un polipéptido IL-22 nativo.

Otra realización de la presente invención está dirigida al uso de un antagonista de anticuerpo de polipéptido de IL-22 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de un trastorno pancreático.

ES 2 316 454 T3

En otras realizaciones, tal y como se define en las reivindicaciones, la presente invención proporciona métodos de detección y diagnóstico de trastornos pancreáticos mediante el contacto de muestras biológicas sospechosas de trastornos pancreáticos. La detección y el diagnóstico de un trastorno pancreático en la muestra biológica pueden incluir la determinación del nivel de expresión de IL-22, efectos de la expresión de IL-22 en PAP-1, o el sondeo de la muestra biológica con IL-22.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID NO: 1) de un ADNc de IL-22 de secuencia nativa, donde SEC ID NO: 1 es un clon designado en la presente invención como "DNA125185-2906".

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 2) derivada de la secuencia codificante de SEC ID NO: 1 mostrada en la Figura 1.

La Figura 3 muestra transferencias Northern sondadas con una sonda de receptor de interleuquina-22.

La Figura 4 muestra la expresión de ARN de receptor de interleuquina-22 de varios tejidos humanos tal y como se analiza mediante análisis Taqman™.

La Figura 5 muestra la activación de STAT en una línea celular acinar pancreática estimulada con IL-22.

La Figura 6A muestra la regulación por incremento de ARN de Proteína Asociada a Pancreatitis (PAP-1) en una línea celular acinar pancreática estimulada con IL-22 tal y como se analiza mediante transferencia Northern.

La Figura 6B muestra la regulación por incremento de PAP1 y de ARN de Osteopontina en células acinares pancreáticas primarias aisladas estimuladas con IL-22 tal y como se analiza mediante transferencia Northern.

La Figura 7 muestra la regulación por incremento de PAP1 en páncreas *in vivo* utilizando ratones inyectados con IL-22 y seguido de análisis de transferencia Northern.

La Figura 8 muestra los niveles de producción de interleuquina-6 (IL-6) en ratones de tipo salvaje (WT) deficientes en receptor beta de IL-10 (IL-10R β).

La Figura 9 que la expresión de PAP1 no se regula por incremento en páncreas *in vivo* en ratones deficientes en IL-10R β tratados con IL-22 tal y como se analiza mediante transferencia Northern.

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-10R β .

La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-22R.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

Los términos "polipéptido IL-22" y "IL-22" tal y como se utilizan en la presente invención, se refieren a secuencias de polipéptido específicas tal y como se describen en la presente invención. Los polipéptidos IL-22 descritos en la presente invención pueden aislarse de una variedad de fuentes, tales como tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. Por ejemplo, las descripciones de la preparación, purificación, derivación, formación de anticuerpos para o contra el mismo, la administración, composiciones que lo contienen, tratamiento de una enfermedad con, etc., se refieren a cada polipéptido de la presente invención de forma individual. El término "polipéptido IL-22" también incluye variantes de los polipéptidos IL-22 descritos en la presente invención.

Un "polipéptido IL-22 de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido IL-22 derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos IL-22 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido IL-22 de secuencia nativa" comprende específicamente formas secretadas o truncadas naturales del polipéptido IL-22 específico, formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme ("spliced") alternativas) y variantes alélicas naturales del polipéptido. El polipéptido IL-22 de secuencia nativa puede comprender los aminoácidos 1 a 179 de la figura 2 (SEC ID No. 2) y son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa. Los codones de inicio y parada se muestran en letra negrita y están subrayadas en la figura 1 (SEC ID No. 1). Sin embargo, aunque el polipéptido IL-2 descrito en la figura 2 (SEC ID No. 2) se muestra que empieza con residuos de metionina designados en la presente invención como posición 1 de los aminoácidos en la figura 2 (SEC ID No. 2), es concebible y posible que se puedan utilizar otros residuos de metionina situados "upstream" o "downstream" desde la posición 1 de los aminoácidos en la figura 2 (SEC ID No. 2) como el residuo de aminoácido de partida de los polipéptidos IL-22.

ES 2 316 454 T3

La localización aproximada de los “péptidos señal” de los diversos polipéptidos IL-22 descritos en la presente invención se muestra en la presente descripción y/o las figuras que se acompañan. Sin embargo, hay que indicar que el extremo C-terminal de un péptido señal puede variar, pero muy probablemente por no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier parte del extremo C-terminal del péptido señal según se ha identificado inicialmente en la presente invención, donde el extremo C-terminal del péptido señal se puede identificar según el criterio utilizado habitualmente en la técnica para identificar este tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen *et al.*, Prot. Eng. 10:1-6 (1997) y von Henje *et al.*, Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Además, también se sabe que, en algunos casos, la división de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, dando lugar a más de una especie secretada. La presente invención también contempla estos polipéptidos maduros, en los que el péptido señal se divide en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier parte del extremo C-terminal del péptido señal según se ha identificado inicialmente en la presente invención, y los polinucleótidos que los codifican.

La “variante de polipéptido IL-22” significa un polipéptido IL-22 activo tal y como se ha definido anterior o posteriormente que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido IL-22 de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido IL-22 que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido IL-22 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Entre dichas variantes de polipéptido IL-22 se incluyen, por ejemplo, polipéptidos IL-22 en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden, o se eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Habitualmente, una variante de polipéptido IL-22 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de polipéptido IL-22 de secuencia nativa de longitud completa con (a) los aminoácidos aproximadamente 1 o aproximadamente 33 hasta aproximadamente 179 de la secuencia del polipéptido IL-22 tal y como se ha descrito en la figura 2 (SEC ID No. 2) (b) X hasta 179 de la secuencia del polipéptido IL-22 mostrada en la figura 2 (SEC ID No. 2), donde X es cualquier aminoácido desde 29 hasta 38 de la figura 2 (SEC ID No. 2), o (c) cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia del polipéptido IL-22 de longitud completa tal como se muestra en la figura 2 (SEC ID No. 2). Habitualmente, los polipéptidos variantes de IL-22 tienen por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del polipéptido IL-22 identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de polipéptido IL-22, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documen-

ES 2 316 454 T3

tación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no es igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizando este procedimiento, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "Proteína de comparación" con la secuencia de aminoácidos denominada como "IL-22", en la que "IL-22" representa la secuencia de aminoácidos de un hipotético polipéptido IL-22 de interés, "Proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que se está comparando el polipéptido "IL-22" de interés, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos.

A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores en % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad en la secuencia de aminoácidos también se pueden obtener tal y como se describe a continuación mediante la utilización del programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento ("overlap span") = 1, fracción de solapamiento ("overlap fraction") = 0,125, umbral de palabra ("word threshold") T = 11, y matriz de puntuación ("scoring matrix") = BLOSUM 62. Cuando se utiliza WU-BLAST-2, el valor en % de identidad en la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-22 de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido IL-22 nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara el polipéptido IL-22 de interés que puede ser un polipéptido variante IL-22) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido IL-22 de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B", la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-22 de interés.

El porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos también se puede determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o bien se obtiene del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo, por ejemplo, desenmascarado = sí, cadena = todos, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, e-valor de multipaso = 0,01, constante para multipaso = 25, caída para alineación con espacios final ("dropoff for final gapped alignment") = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62.

En las situaciones en las que se utiliza NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A con B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A.

ES 2 316 454 T3

El “polipéptido variante IL-22” o “secuencia de ácidos nucleicos variante de IL-22” significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-22 activo tal y como se define a continuación y que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido IL-22 de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido IL-22 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido IL-22 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Habitualmente, un polinucleótido variante IL-22 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido IL-22 de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido IL-22 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido IL-22, con o sin la secuencia del péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido IL-22 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

Normalmente, los polinucleótidos variantes IL-22 tienen por lo menos 30 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican IL-22 identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de IL-22 de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

100 veces la fracción W/Z

ES 2 316 454 T3

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C con D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D con C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos denominada como "ADN de comparación" con la secuencia de ácidos nucleicos denominada "ADN de IL-22", en la que "ADN de IL-22" representa una hipotética secuencia de ácidos nucleicos que codifica IL-22 de interés, "ADN de comparación" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que se está comparando la molécula de ácido nucleico "ADN de IL-22" de interés, y "N", "L" y "V" representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos.

A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se pueden obtener tal y como se describe a continuación mediante la utilización del programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan a los valores por defecto. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento ("overlap span") = 1, fracción de solapamiento ("overlap fraction") = 0,125, umbral de palabra ("word threshold") T = 11, y matriz de puntuación ("scoring matrix") = BLOSUM 62. Cuando se utiliza WU-BLAST-2, el valor en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se determina dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-22 de interés que tiene una secuencia derivada del ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-22 de secuencia nativa y la molécula de ácido nucleico de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-22 de interés que puede ser un polipéptido variante IL-22) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-22 de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos nucleicos B", la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácidos nucleicos B es la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-22 de interés.

El porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se puede determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o bien se obtiene del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo, por ejemplo, desenmascarado = sí, cadena = todos, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, e-valor de multipaso = 0,01, constante para multipaso = 25, caída para alineación con espacios final ("dropoff for final gapped alignment") = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62.

En las situaciones en las que se utiliza NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C con D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D con C.

Los polinucleótidos variantes de IL-22 pueden ser moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido IL-22 activo y que son capaces de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado astringentes, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido IL-22 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Los polipéptidos variantes de IL-22 pueden ser aquellos que son codificados por un polinucleótido variante de IL-22.

El término "aislado" cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa

giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido IL-22 no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

5 Un ácido nucleico “aislado” que codifica un polipéptido IL-22 u otro ácido nucleico “aislado” que codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica que codifica el polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-IL-22 individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas, y neutralizantes), composiciones de anticuerpo anti-IL-22 con especificidad poliepitópica, anticuerpos anti-IL-22 de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-IL-22 (ver a continuación). El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

La “astringencia” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel y *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones astringentes” o “condiciones de astringencia elevada”, tal como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquellas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de astringencia elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las “condiciones moderadamente astringentes” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximada-

ES 2 316 454 T3

mente 37-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

5 El término “epítipo etiquetado”, cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido IL-22 fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo frente al que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo no reacciona de forma cruzada sustancialmente con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

15 Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “inmuno adhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente de la de reconocimiento y sitio de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de 20 inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

25 “Activo” o “actividad” para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de un polipéptido IL-22 que conservan una actividad biológica y/o inmunológica de IL-22 nativo o natural, donde actividad “biológica” se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) provocada por un IL-22 nativo o natural diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un IL-22 nativo o natural y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un IL-22 nativo o natural. Una actividad biológica preferida es la inducción de la expresión de PAPI. PAPI es una proteína secretada relacionada con la familia REG de factores tróficos y se caracterizó inicialmente como una proteína con expresión elevada en la pancreatitis (Iovanna *et al.*, (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 24664-24669). La inyección *in vivo* de IL-22 dio lugar a una inducción rápida de la expresión de PAPI en el páncreas.

35 El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido IL-22 nativo descrito en la presente invención. De forma similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que mimetiza una actividad biológica de un polipéptido IL-22 nativo descrito en la presente invención. Entre las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas se incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos IL-22 nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, pequeñas moléculas orgánicas agonistas o antagonistas, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido IL-22 pueden comprender poner en contacto un polipéptido IL-22 con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido IL-22.

45 “Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en el que es evitar o ralentizar (disminuir) la condición o trastorno patológico diana. Entre los individuos que necesitan un tratamiento se incluyen individuos que ya padecen el trastorno, así como individuos propensos a padecer el trastorno o individuos en los cuales va a evitarse el trastorno.

50 La administración “crónica” se refiere a la administración del agente o agentes en un modo continuo en oposición a un modo puntual, para mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo largo de tiempo. La administración “intermitente” es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es bastante cíclico en su naturaleza.

55 “Mamífero”, para los objetivos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, animales para deporte o mascotas, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es humano.

60 La administración “combinada con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Los “portadores”, tal y como se utilizan en la presente invención, incluyen portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero expuestos a los mismos en las dosis y concentraciones utilizadas. Frecuentemente, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina;

ES 2 316 454 T3

monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

5 Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; “diabodies”; anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multispecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

10 La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un sitio único de unión a antígeno y un fragmento “Fc” residual, una nomenclatura que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno.

15 “Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDRs confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

20 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

30 Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de invertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

35 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varios de éstas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

40 Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena única” o “sFv” comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv ver Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

45 El término “diabodies” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH - VL). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

50 Un anticuerpo “aislado” es el que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilidades de diagnóstico y terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

65 Un anticuerpo que “se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido o un epítipo particular en un polipéptido particular es aquel que se une a este polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

ES 2 316 454 T3

La palabra “marcador” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo “marcado”. El “marcador” puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Por “fase sólida” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas que se engloban en la presente invención se incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, polivinilalcohol y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149.

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido IL-22 o un anticuerpo para el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

Una “molécula pequeña” se define en la presente invención que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

Una “cantidad eficaz” de un polipéptido descrito en la presente invención o un agonista o antagonista del mismo es una cantidad suficiente para llevar a cabo un objetivo indicado específicamente. Una “cantidad eficaz” se puede determinar empíricamente y de forma rutinaria, en relación con el objetivo indicado.

Un “páncreas activado”, tal como se define en la presente invención, es cuando las enzimas digestivas del páncreas se activan y empiezan a atacar el tejido pancreático.

Una “molécula bioactiva” se define en la presente invención como una toxina, un radiomarcador o un anticuerpo.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 316 454 T3

TABLA 1

```

5      /*
      *
      * C-C increased from 12 to 15
      * Z is average of EQ
      * B is average of ND
10     * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
      */
      #define _M      -8      /* value of a match with a stop */

      int      _day[26][26] = {
15     /* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
      /* A */      { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0 },
      /* B */      { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1 },
      /* C */      { -2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5 },
      /* D */      { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2 },
20     /* E */      { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3 },
      /* F */      { -4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5 },
      /* G */      { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0 },
      /* H */      { -1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2 },
      /* I */      { -1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2 },
25     /* J */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
      /* K */      { -1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0 },
      /* L */      { -2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2 },
      /* M */      { -1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1 },
      /* N */      { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1 },
30     /* O */      { _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M },
      /* P */      { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0 },
      /* Q */      { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3 },
      /* R */      { -2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0 },
      /* S */      { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0 },
35     /* T */      { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0 },
      /* U */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
      /* V */      { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2 },
      /* W */      { -6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6 },
40     /* X */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
      /* Y */      { -3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4 },
      /* Z */      { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4 }
      };

```

```

/*
*/
5  #include <stdio.h>
   #include <ctype.h>

   #define  MAXJMP 16      /* max jumps in a diag */
   #define  MAXGAP 24     /* don't continue to penalize gaps larger than this */
10  #define  JMPS 1024    /* max jmps in an path */
   #define  MX 4         /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

   #define  DMAT 3       /* value of matching bases */
15  #define  DMIS 0       /* penalty for mismatched bases */
   #define  DINSO 8      /* penalty for a gap */
   #define  DINS1 1      /* penalty per base */
   #define  PINSO 8      /* penalty for a gap */
20  #define  PINS1 4      /* penalty per residue */

   struct jmp {
       short      n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
       unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
25  };                             /* limits seq to 2^16 -1 */

   struct diag {
       int      score;           /* score at last jmp */
       long     offset;         /* offset of prev block */
30  short     ijmp;            /* current jmp index */
       struct jmp jp;          /* list of jmps */
   };

35  struct path {
       int      spc;            /* number of leading spaces */
       short    n[JMPS];      /* size of jmp (gap) */
       int      x[JMPS];      /* loc of jmp (last elem before gap) */
40  };

   char      *ofile;          /* output file name */
   char      *namex[2];      /* seq names: getseqs() */
   char      *prog;          /* prog name for err msgs */
45  char      *seqx[2];      /* seqs: getseqs() */
   int      dmax;           /* best diag: nw() */
   int      dmax0;          /* final diag */
   int      dna;            /* set if dna: main() */
   int      endgaps;        /* set if penalizing end gaps */
50  int      gapx, gapy;     /* total gaps in seqs */
   int      len0, len1;     /* seq lens */
   int      ngapx, ngapy;   /* total size of gaps */
   int      smax;           /* max score: nw() */
55  int      *xbm;           /* bitmap for matching */
   long     offset;        /* current offset in jmp file */
   struct    diag *dx;      /* holds diagonals */
   struct    path pp[2];    /* holds path for seqs */

60  char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
   char      *getseq(), *g_calloc();

```

65

ES 2 316 454 T3

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int      ac;
char     *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;
    ofile = "align.out";
    nw();
    readjumps();
    print();
    cleanup();
}

```

ES 2 316 454 T3

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int           *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;               /* score for each type */
    int           ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register      id;                /* diagonal index */
    register      ij;                /* jmp index */
    register      *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbrn[*px-'A']&xbrn[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
   * favor new del over ongong del
   */
  if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else
      ndelx++;
  }

  /* pick the maximum score; we're favoring
   * mis over any del and delx over dely
   */

```

55

60

65

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
5   else if (delx >= dely[yy]) {
        coll[yy] = delx;
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
10      && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
15          }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
20    }
    else {
        coll[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
25      && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
30          }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
35    }
    if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
        */
        if (endgaps)
            coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
        if (coll[yy] > smax) {
            smax = coll[yy];
            dmax = id;
40        }
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
50 }
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

60

65

ES 2 316 454 T3

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
5  * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
10 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

15 #define SPC      3
#define P_LINE    256 /* maximum output line */
#define P_SPC     3 /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;          /* set output line length */
FILE    *fx;          /* output file */

print()                                                    print
{
25     int     lx, ly, firstgap, lastgap;          /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
            cleanup(1);
        }
30     fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
35     if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
            pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
            ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
40     pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
            lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
            lastgap = len0 - dmax0 - 1;
            lx = lastgap;
45     }
        else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
            lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
            ly = lastgap;
        }
50     getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();
}

```

55

60

65

ES 2 316 454 T3

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
5 getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;
    int    firstgap, lastgap;
    /* "core" (minus endgaps) */
    /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
10    char    outx[32];
    double    pct;
    register    n0, n1;
    register char    *p0, *p1;

    /* get total matches, score
    */
15    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
25             p1++;
             n1++;
             siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
30        }
        else {
            if (x[bm[*p0-'A']&x[bm[*p1-'A']])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
40        }
    }

    /* pct homology:
    * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
    * else, knock off overhangs and take shorter core
    */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
50    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%=d match%$ in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

55

60

65

ES 2 316 454 T3

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outr, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outr);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outr, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outr);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINSI);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINSO, PINSI);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;       /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];      /* jmp index for a path */
static      nc[2];      /* number at start of current line */
static      ni[2];      /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];     /* ptr to current element */
static char *po[2];     /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align0
{
    int      nn;        /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

ES 2 316 454 T3

...pr_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
              */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);

            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i] = '\0';
}

```

dumpblock

ES 2 316 454 T3

...dumpblock

```

5      (void)putc('\n', fx);
      for (i = 0; i < 2; i++) {
          if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' '))
              if (i == 0)
                  nums(i);
                  if (i == 0 && *out[1])
                      stars();
                      putline(i);
                      if (i == 0 && *out[1])
                          fprintf(fx, star);
                          if (i == 1)
                              nums(i);
              }
          }
15     }

/*
   * put out a number line: dumpblock()
   */
20     static
     nums(ix)                                nums
     {
         int        ix;        /* index in out[] holding seq line */

         char        nline[P_LINE];
         register   i, j;
         register char *pn, *px, *py;

25         for (pn = nline, i = 0; i < lmax + P_SPC; i++, pn++)
             *pn = ' ';
         for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
             if (*py == ' ' || *py == '-')
                 *pn = ' ';
30             else {
                 if (i % 10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                     j = (i < 0) ? -i : i;
                     for (px = pn; j /= 10, px--)
                         *px = j % 10 + '0';
                     if (i < 0)
                         *px = '-';
35                 }
                 else
                     *pn = ' ';
                 i++;
             }
         }
         *pn = '\0';
         nc[ix] = i;
         for (pn = nline; *pn; pn++)
45         (void)putc(*pn, fx);
     }

/*
   * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
   */
50     static
     putline(ix)                                putline
     {

```

```

int          i;
register char *px;

5
for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void)putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void)putc(' ', fx);

10
/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void)putc(*px&0x7F, fx);
15
(void)putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
20
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;
    (void)putc(' ', fx);

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
55
char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void)strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
65
}

```

ES 2 316 454 T3

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
5  * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

10 char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";           /* tmp file for jumps */
FILE     *fj;

int      cleanup();                             /* cleanup tmp file */
long     lseek();

15 /*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                     cleanup
20 {
    int    i;

    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

25 /*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
30 char    *
getseq(file, len)                             getseq
    char    *file;    /* file name */
    int     *len;     /* seq len */
{
    char    line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
40         fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
50         fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

55
60
65

```

ES 2 316 454 T3

--getseq

```

5      py = pseq + 4;
      *len = len;
      rewind(fp);

      while (fgetc(line, 1024, fp)) {
          if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
              continue;
          for (px = line; *px != '\n'; px++){
10             if (isupper(*px))
                    *py++ = *px;
                else if (islower(*px))
                    *py++ = toupper(*px);
                if (index("ATGCU",*(py-1)))
                    natgc++;
15         }
      }
      *py++ = '\0';
      *py = '\0';
      (void) fclose(fp);
      dna = natgc > (len/3);
      return(pseq+4);
}

char *
25 g_alloc(msg, nx, sz)
      char *msg;          /* program, calling routine */
      int nx, sz;        /* number and size of elements */
{
      char *px, *calloc;

      if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
30         if (*msg) {
                fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                exit(1);
            }
        }
      return(px);
}

/*
40 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
*/
readjmps
{
      int fd = -1;
      int siz, i0, i1;
      register i, j, xx;

45     if (fj) {
            (void) fclose(fj);
            if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                    fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                    cleanup(1);
            }
50     }
      for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
            while (1) {
                    for (j = dx[dmax].jimp; j >= 0 && dx[dmax].jpx[j] >= xx; j--)
55             ;
            }
        }
    }
}

```

g_alloc

readjmps

ES 2 316 454 T3

...readjmps

```

5         if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
10    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
15    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
20            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
             */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
25 /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
30            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
35            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
    }
    else
        break;
40 }
/* reverse the order of jmps
 */
for (j = 0, i0--, j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
45 }
for (j = 0, i1--, j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
50 }
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
55 }
}

```

60

65

ES 2 316 454 T3

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw0
 */
writejmps(ix)                                     writejmps
5      int      ix;
{
      char      *mktemp0;

      if (!fj) {
10         if (mktemp(jname) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't mktemp0 %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
            if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
15                fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                exit(1);
            }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
20     }

```

TABLA 2

25	IL-22	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
30	Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad en la secuencia de aminoácidos =
 (el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido IL-22) =
 5 dividido por 15 = 33,3%

TABLA 3

50	IL-22	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
55	Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =
 (el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido IL-22) =
 5 dividido por 10 = 50%

B. Variantes de Polipéptidos IL-22

Además de los polipéptidos IL-22 de secuencia nativa de longitud completa descritos en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de IL-22. Las variantes de IL-22 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de IL-22, y/o mediante la síntesis del polipéptido IL-22 deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del IL-22, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a la membrana.

Las variaciones en el IL-22 de secuencia nativa de longitud completa o en varios dominios del IL-22 descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente USA 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el IL-22 que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del IL-22 en comparación con el IL-22 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del IL-22. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del IL-22 con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizadas en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

En la presente invención se proporcionan fragmentos de polipéptido IL-22. Dichos fragmentos se pueden trincar en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido IL-22.

Los fragmentos de IL-22 se pueden preparar mediante cualquiera de un grupo de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de IL-22 mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores del extremo 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de polipéptido IL-22 comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido IL-22 nativo descrito en la presente invención.

Las sustituciones particulares de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones de ejemplo en la Tabla 6, o tal y como se describen posteriormente en referencia a las clases de aminoácidos, y se criban los productos.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 316 454 T3

TABLA 6

	Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
5	Ala (A)	val; leu; ile	val
	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
10	Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
	Asp (D)	glu	glu
15	Cys (C)	ser	ser
	Gln (Q)	asn	asn
	Glu (E)	asp	asp
20	Gly (G)	pro; ala	ala
	His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
25	Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
30	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
35	Phe (F)	leu; val; ile, ala; tyr	leu
	Pro (P)	ala	ala
	Ser (S)	thr	thr
40	Thr (T)	ser	ser
	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
45	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

50 Las modificaciones sustanciales en la identidad funcional o inmunológica del polipéptido IL-22 se llevan a cabo mediante la selección de las sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el conjunto de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 55 (1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr;
- 60 (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- 65 (6) aromática: trp, tyr, phe.

ES 2 316 454 T3

Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

5 Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para producir el ADN variante de IL-22 se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter *et al.*, Nucl. Acids. Res., 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids. Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells *et al.*, Gene, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 10 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

El análisis de aminoácido por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido 15 de rastreo preferido en este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se 20 puede utilizar un aminoácido isotérico.

C. Modificaciones de IL-22

Las modificaciones covalentes de IL-22 están incluidas en el alcance del término "IL-22". Un tipo de modificación 25 covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un polipéptido IL-22 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del IL-22. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular IL-22 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-IL-22, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, 30 glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimido-35 dato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de 40 residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido IL-22 comprende la alteración del patrón de glicosilación 45 nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en IL-22 de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el IL-22 de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido IL-22 se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos. 50 La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina al IL-22 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos de IL-22 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido IL-22 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

55 Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido IL-22 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981).

60 La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido IL-22 se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación químicas son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et al.* Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge, *et al.* Anal. Biochem., 65 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato del polipéptido se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endoglicosidasas y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura *et al.* Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

ES 2 316 454 T3

Otro tipo de modificación covalente de IL-22 comprende la unión del polipéptido IL-22 a uno de un conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

5 El IL-22 también se puede modificar de manera que forma una molécula quimérica que comprende IL-22 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

Dicha molécula quimérica puede comprender una fusión del IL-22 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo terminal amino o carboxilo del IL-22. La presencia de dichas formas epítipo etiquetadas del IL-22 se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el IL-22 se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido-Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin *et al.*, Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de α -tubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

Alternativamente, la molécula quimérica puede comprender una fusión del IL-22 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como “inmunoadhesina”), dicha fusión podría ser a una región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido IL-22 en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. De manera particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de USA No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

D. Preparación de IL-22

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de IL-22 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de IL-22. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar IL-22. Por ejemplo, la secuencia de IL-22, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewan *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes del IL-22 de forma separada y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir IL-22 de longitud completa.

1. Aislamiento del ADN que codifica IL-22

El ADN que codifica IL-22 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de IL-22 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de IL-22 humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica IL-22 también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para IL-22 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica IL-22 es utilizar la metodología de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ³²P, biotinylation o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en los bancos de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otros bancos de datos de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen en la presente invención.

El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción de IL-22 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un técnico en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos por el técnico en la materia, por ejemplo, CaCl₂, CaPO₄, mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas para dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en la levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown *et al.*, *Methods in enzymology*, 185:527-537 (1990) y Manssur *et al.*, *Nature*, 336. 348-352 (1988).

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa huésped para fermentaciones de producto de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo tonA; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo tonA ptr3; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan'; la cepa de *E. coli* W3110 37D6 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan'; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación por eliminación degP no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican IL-22. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Lourencourt *et al. J. Bacterial.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilaram* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris*

(EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma recai* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); Schwanniomycetes, tales como *Schwanniomycetes occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyposcladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes
 5 *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Til-
 bum *et al.*, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger*
 (Nelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metiltrópicas son adecuadas en la presente invención e
 incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionado del género que consiste en
 10 *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas
 que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs,
 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de IL-22 glicosilado se derivan de organismos multicelulares.
 Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera*
 15 Sf9, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles se incluyen células
 de ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón
 de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o células
 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de
 ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de
 20 sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL
 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCI51). La
 selección de la célula huésped apropiada se estima que está dentro de la técnica.

3. Selección y utilización de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica IL-22 se puede insertar en un vector
 replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públi-
 camente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de
 ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN
 30 se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los
 componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de
 replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la
 transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas
 de unión estándar que son conocidas por un técnico en la materia.

El IL-22 se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión
 con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división
 específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser
 un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el IL-22 que se inserta en el vector. La
 40 secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias
 líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras,
 la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor
 alfa líder (incluyendo las secuencias líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la
 Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans*
 45 *glucoamilasa* (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de
 noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar
 para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o
 especies relacionadas, así como secuencias líderes virales secretoras.

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación
 del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacte-
 rias, levaduras, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias
 gram-negativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, polioma,
 50 adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como
 marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióti-
 cos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias
 auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica
 60 D-alanina racemasa para Bacilli.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la
 identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica IL-22, tal como DHFR o timidina
 quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente
 65 en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido
 de la levadura YRp7 [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper
et al., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura

ES 2 316 454 T3

que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

5 Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica IL-22 para dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica IL-22.

15 Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

20 Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657.

25 La transcripción de IL-22 desde vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar (Patente del Reino Unido 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

30 Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el IL-22 por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en *cis* de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente, se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de IL-22, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' con respecto al promotor.

45 Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica IL-22.

50 En Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de IL-22 en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

4. Detección de la amplificación/expresión de los genes

55 La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de manchas ("blots") (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadena doble de ARN, cadenas dobles híbridas de ADN-ARN o cadena doble de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la cadena doble está unida a una superficie, de manera que tras la formación de la cadena doble en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpo unido a la cadena doble.

65 Alternativamente, la expresión génica se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o

ensayo de fluidos de ejemplo pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. De manera conveniente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido IL-22 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de IL-22 que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

5

5. Purificación de polipéptidos

Las formas de IL-22 se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisatos de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión de IL-22 se pueden destruir mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar células.

10

Se puede desear purificar IL-22 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefrosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo del IL-22. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el IL-22 concreto producido.

15

20

25 E. Usos para IL-22

Las secuencias de nucleótidos (o sus complementarias) que codifican IL-22 tiene varias aplicaciones en la disciplina de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en el mapeo de cromosomas y genes y en la generación de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico de IL-22 también será útil para la preparación de polipéptidos IL-22 mediante las técnicas recombinantes descritas en la presente invención.

30

El gen de IL-22 de secuencia nativa de longitud completa, o partes del mismo, se pueden utilizar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de IL-22 de longitud completa o para aislar incluso otros ADNcs (por ejemplo, aquéllos que codifican variantes naturales de IL-22 o IL-22 de otras especies) que tienen una identidad en la secuencia deseada con la secuencia de IL-22 nativa descrita en la presente invención. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación se pueden derivar de regiones por lo menos parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa en la que dichas regiones se pueden determinar sin una experimentación excesiva o de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de IL-22 de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen de IL-22 utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación se pueden marcar con una serie de marcadores, incluyendo radionucleótidos, tales como ³²P o ³⁵S, marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de los sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen de IL-22 de la presente invención se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar a qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen con mayor detalle en los siguientes Ejemplos.

35

40

45

Cualquier secuencia EST descrita en la presente solicitud se puede utilizar de forma similar como sondas, utilizando los procedimientos descritos en la presente invención.

50

Entre otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de IL-22 se incluyen oligonucleótidos antisentido o sentido que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de cadena única (ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm de IL-22 diana (sentido) o ADN de IL-22 diana (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido, según la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante de ADN de IL-22. Dicho fragmento comprende generalmente por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basado en una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (*Cancer Res.*, 48:2659, 1988) y van der Krol *et al.* (*BioTechniques* 6:958, 1988).

55

La unión de oligonucleótidos sentido y antisentido a secuencias de ácidos nucleico diana da lugar a la formación de cadenas dobles que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno de los diferentes medios, que incluyen una mayor degradación de las cadenas dobles, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o mediante cualquier otro medio. De este modo, los oligonucleótidos antisentido se puede utilizar para bloquear la expresión de proteínas IL-22. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones a azúcares, tales como las descritas en WO 91/06629) y en los que dichas uniones a azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones a azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero mantienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

60

65

ES 2 316 454 T3

Entre otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido se incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a grupos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros grupos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácidos nucleicos diana, tal como poli-(L-lisina). Además, los agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos se pueden unir a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido para la secuencia de nucleótidos diana.

Los oligonucleótidos sentido o antisentido se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante cualquier procedimiento de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO₄, electroporación, o mediante la utilización de vectores de transferencia de genes, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido antisentido o sentido se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, *in vivo* o *ex vivo*. Entre los vectores retrovirales adecuados se incluyen, pero no se limitan a, los derivados de retrovirus murinos M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de copia doble designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

Los oligonucleótidos sentido o antisentido también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión ligando, tal y como se describe en WO 91/04753. Entre las moléculas de unión ligandos se incluyen, pero no se limitan a, receptores de la superficie de las células, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie de las células. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión ligando para unirse a su correspondiente molécula o receptor, ni bloquea la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

Alternativamente, se puede introducir un oligonucleótido sentido o antisentido en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal y como se describe en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia preferiblemente en el interior de la célula por una lipasa endógena.

Las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido tienen generalmente por lo menos aproximadamente 5 bases de longitud, aproximadamente 10 bases de longitud, aproximadamente 15 bases de longitud, aproximadamente 20 bases de longitud, aproximadamente 25 bases de longitud, aproximadamente 30 bases de longitud, aproximadamente 35 bases de longitud, aproximadamente 40 bases de longitud, aproximadamente 45 bases de longitud, aproximadamente 50 bases de longitud, aproximadamente 55 bases de longitud, aproximadamente 60 bases de longitud, aproximadamente 65 bases de longitud, aproximadamente 70 bases de longitud, aproximadamente 75 bases de longitud, aproximadamente 80 bases de longitud, aproximadamente 85 bases de longitud, aproximadamente 90 bases de longitud, aproximadamente 95 bases de longitud, aproximadamente 100 bases de longitud, o más.

Las sondas también se pueden utilizar en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para la identificación de secuencias de codificación de IL-22 estrechamente relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un IL-22 también se pueden utilizar para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica el IL-22 y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden mapear en un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como la hibridación *in situ*, el análisis de unión contra marcadores cromosómicos conocidos, y el cribado de hibridación con bibliotecas.

Cuando las secuencias codificantes de IL-22 codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el IL-22 es un receptor), el IL-22 se puede utilizar en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos procedimientos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión también se pueden utilizar para cribar inhibidores o agonistas de péptidos o moléculas pequeñas de la interacción de unión. Además, el receptor IL-22 se puede utilizar para aislar el ligando o ligandos correlativos. Se pueden diseñar ensayos de cribado ("screening") para encontrar compuestos candidatos que mimetizan la actividad biológica de un IL-22 nativo o un receptor para IL-22. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribar con un alto rendimiento bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar pequeñas moléculas como fármacos candidatos. Entre las pequeñas moléculas contempladas se incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican IL-22 o sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual se introdujo en el animal o en un antecesor del animal en estado prenatal, por ejemplo, una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADN que codifica IL-22 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica IL-22 según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica IL-22. Los procedimientos para generar animales

transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en habituales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, se marcarían células concretas para la incorporación del transgén de IL-22 con potenciadores específicos de tejido. Se pueden utilizar animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica IL-22 introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria, para examinar el efecto de la expresión aumentada de ADN que codifica IL-22. Dichos animales se pueden utilizar como animales de prueba para reactivos pensados para conferir protección frente a, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. Según este aspecto de la presente invención, el tratamiento de un animal con el reactivo y la reducción de la incidencia de la condición patológica en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una potencial intervención terapéutica en la condición patológica.

Alternativamente, se pueden utilizar homólogos no humanos de IL-22 para construir un animal “knock out” con IL-22 que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica IL-22 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica IL-22 y el ADN genómico alterado que codifica IL-22 introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica IL-22 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica IL-22 según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica IL-22 se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madres embrionarias (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152]. A continuación, un embrión quimérico se puede implantar en un animal criado hembra pseudoembarazada adecuado y el embrión nacido para crear un animal “knock out”. La progenie que alberga el ADN recombinado homológamente en las células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y utilizar para criar animales en los que todas las células de los mismos contienen el ADN recombinado homológamente. Los animales knock out se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido IL-22.

El ácido nucleico que codifica los polipéptidos IL-22 también se pueden utilizar en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células para conseguir una síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. La “terapia génica” incluye tanto la terapia génica convencional en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una vez o repetitiva de un ADN o ARN terapéuticamente eficaz. Se pueden utilizar ADN y ARNs antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. También se ha observado que los oligonucleótidos antisentido cortos se pueden importar en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su captación limitada por la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos diéster cargados negativamente por grupos no cargados.

Existe una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped deseado. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen la utilización de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico, etc. Entre las técnicas de transferencia génica *in vivo* actuales preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (habitualmente retrovirales) y la transfección mediada por liposoma-proteínas de cubierta viral (Dzau *et al.*, *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácidos nucleicos con un agente que marca las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie de la célula o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie de la célula asociada con endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo, de proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la vida media intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por receptor se describe en, por ejemplo, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica, véase Anderson *et al.*, *Science* 256, 808-813 (1992).

Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla del principio activo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales

ES 2 316 454 T3

como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o PEG.

5 Las formulaciones a utilizar para la administración *in vitro* debe ser estéril. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles, previamente o posteriormente a la liofilización y reconstitución.

10 Las composiciones terapéuticas de la presente invención generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica.

15 La ruta de administración está en concordancia con procedimientos conocidos, por ejemplo, la inyección o la infusión mediante las rutas intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica, o mediante sistemas de liberación controlada.

20 Las dosis y concentraciones del fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo de la utilización particular prevista. La determinación de la dosis o la ruta de administración apropiadas están dentro del conocimiento de un médico habitual. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. El escalado entre especies de dosis eficaces se puede llevar a cabo siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds., Pergamon Press, Nueva York, 1989, páginas 42-96.

30 Cuando se utiliza la administración *in vivo* de un antagonista de IL-22, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de masa corporal de mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente 1 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. Las guías de las dosis concretas y los procedimientos de liberación se proporcionan en la literatura; véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración que se dirige a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la liberación de una manera diferente a la de otro órgano o tejido.

35 La presente invención comprende procedimientos de cribado de compuestos para identificar aquéllos que evitan el efecto del polipéptido IL-22 (antagonistas). Los ensayos de cribado para candidatos de fármacos antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos IL-22 codificados por los genes identificados en la presente invención, o bien interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribar con un alto rendimiento bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar pequeñas moléculas como fármacos candidatos.

40 Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

45 Todos los ensayos para antagonistas son comunes en que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido IL-22 codificado por un ácido nucleico identificado en la presente invención bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

50 En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido IL-22 codificado por el gen identificado en la presente invención o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtítulos, mediante enlaces covalentes o no covalentes. La unión covalente se realiza generalmente mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido IL-22 y el secado. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido IL-22 a inmovilizar, para anclarlo a la superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, que se puede marcar mediante un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se extraen los componentes no reaccionados, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados a la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que tuvo lugar la complejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la complejación, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

60 Si el compuesto candidato interacciona, pero no se une a un polipéptido IL-22 particular codificado por un gen identificado en la presente invención, su interacción con este polipéptido se puede ensayar mediante procedimientos conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, coimmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorizar mediante la utilización de sistemas genéticos basados en levaduras descritos por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)), tal como se describe por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991)). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno actuando como el dominio de unión a ADN, el otro actuando

como el dominio de transcripción-activación. El sistema de expresión en las levaduras descrito en las publicaciones anteriores (referido generalmente como “el sistema de dos híbridos”) saca ventaja de esta propiedad e utiliza dos proteínas híbridas, una en la que se fusiona la proteína diana al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de la interacción de proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromatogénico para β -galactosidasa. En Clontech se encuentra disponible comercialmente un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Este sistema también se puede extender para mapear dominios de proteínas implicados en las interacciones de proteínas específicas así como para precisar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido IL-22 identificado en la presente invención y otros componentes intracelulares o extracelulares se puede ensayar tal y como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intracelular o extracelular bajo condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se desarrolla en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción para usar como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intracelular o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal y como se describe anteriormente en la presente invención. La formación del complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

Para ensayar antagonistas, el polipéptido IL-22 se puede añadir a una célula junto con el compuesto a cribar para una actividad concreta y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido IL-22 indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido IL-22. Alternativamente, los antagonistas se pueden detectar mediante la combinación del polipéptido IL-22 y un antagonista potencial con los receptores o receptores recombinantes de polipéptido IL-22 unidos a membrana bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido IL-22 se puede marcar, por ejemplo, mediante radiactividad, de manera que el número de moléculas de polipéptidos IL-22 unidas al receptor se pueden utilizar para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor se puede identificar mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, “panning” de ligando y clasificación por FACS. Coligan *et al.* Current Protocols in Immun., 1(2): Capítulo 5 (1991). Preferiblemente, se utiliza la clonación de la expresión en la que el ARN poliadrenilado se prepara a partir de una célula sensible al polipéptido IL-22 y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido IL-22. Las células transfectadas que se desarrollan sobre portamuestras de vidrio se exponen a polipéptido IL-22 marcado. El polipéptido IL-22 se puede marcar mediante una variedad de medios que incluyen la yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Tras la fijación e incubación, los portamuestras se someten a un análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y los sub-grupos se preparan y se retransfectan utilizando un proceso de subgrupación y recibiendo interactivos, obteniendo finalmente un único clon que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamíferos o una preparación de membrana que expresa el receptor se incubaría con polipéptido IL-22 marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto para aumentar o bloquear esta interacción.

Más ejemplos específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con polipéptido IL-22, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos y las versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido IL-22 que reconoce el receptor pero no transmite el efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido IL-22.

Otro potencial antagonista del polipéptido IL-22 es una construcción de ADN o ARN antisentido preparada utilizando tecnología antisentido, cuando, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN antisentido actúa para bloquear directamente la traducción del ARNm mediante la hibridación a ARNm marcado y evitando la traducción de la proteína. La tecnología antisentido se puede utilizar para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o ADN o ARN antisentido, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia del polinucleótido, que codifica los polipéptidos IL-22 maduros de la presente invención, se utiliza para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee *et al.*, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science, 241: 456 (1988); Dervan *et al.*, Science, 251: 1360 (1991)), evitando así la transcripción y la producción del polipéptido IL-22. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida al ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido IL-22 (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente

también se pueden liberar a las células, de manera que el ARN o ADN antisentido se pueden expresar *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido IL-22. Cuando se utiliza ADN antisentido, se prefieren oligodesoxinucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

5

Entre los antagonistas potenciales se incluyen pequeñas moléculas que se unen al sitio activo, el sitio de unión al receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido IL-22, bloqueando de esta manera la actividad biológica normal del polipéptido IL-22. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, preferiblemente péptidos solubles y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

10

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la división específica de ARN. Las ribozimas actúan mediante la hibridación específica de secuencia al ARN diana complementario, seguido de la división endonucleolítica. Los sitios de división específica de la ribozima en un ARN potencial diana se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994) y publicación de PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

15

Las moléculas de ácido nucleico en la formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser de cadena única y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de las bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que induce la formación de la triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requiere tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de una doble cadena. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación de PCT No. WO 97/33551, *supra*.

20

Estas pequeñas moléculas se pueden identificar mediante uno o más de los ensayos de cribado descritos anteriormente en la presente invención y/o mediante cualquier otra técnica de cribado conocida para un experto en la materia.

25

Los usos diagnósticos y terapéuticos de las moléculas descritas en la presente invención también se pueden basar en los resultados de ensayos funcionales positivos descritos a continuación, tal como se define en las reivindicaciones.

30 F. Anticuerpos anti-IL-22

Entre los anticuerpos anti-IL-22 de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

35

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos anti-IL-22 pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido IL-22 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida por ser inmunógena en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunógenas se incluyen, pero no se limitan a hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un experto en la materia sin una gran experimentación.

45

2. Anticuerpos monoclonales

50

Los anticuerpos anti-IL-22 pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

55

El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido IL-22 o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o se utilizan células de bazo o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o

65

HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (“medio HAT”), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, permiten un nivel de expresión elevado estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) páginas, 51-63].

A continuación, el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se pueden ensayar para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el IL-22. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Poliard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar [Goding, *supra*]. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vitro* como ascites en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido de ascites mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la presente invención sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede situar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de ningún modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias homólogas murinas [Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *supra*] o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la presente invención, o se pueden sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la presente invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas rutinarias conocidas en el sector.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-IL-22 de la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la estructura (“framework”) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o la estructura importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a

las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos se indican frecuentemente como residuos “importados”, que se adquieren habitualmente de un dominio variable “importado”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector, incluyendo las bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)]. De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece estrechamente a la observada en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reajuste de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-51, (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Los anticuerpos también se pueden madurar por afinidad utilizando procedimientos de selección y/o mutagénesis conocidos tal como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tienen una afinidad que es cinco veces, más preferiblemente 10 veces, incluso más preferiblemente 20 ó 30 veces mayor que el anticuerpo de partida (generalmente murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo maduro.

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por el IL-22, el otro es por cualquier otro antígeno, y preferiblemente por una proteína o receptor o subunidad del receptor de la superficie celular.

Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Millstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, CH2, y regiones CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

Según otra estrategia descrita en WO 96/27011, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte de la región de CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean “cavidades”

compensatorias de tamaño similar o idéntico a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

5 Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando uniones químicas. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de nitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar en anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra tumores de mama humanos dianas.

25 Se han descrito varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994). Se consideran anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes en un polipéptido IL-22 determinado de la presente invención. Alternativamente, un brazo anti-polipéptido IL-22 se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el polipéptido IL-22 particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para confinar agentes citotóxicos a células que expresan un polipéptido IL-22 particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a IL-22 y un brazo que se une a un agente citotóxico o un radionúcleo quelante, tal como BOTUBB, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido IL-22 y además se une al factor tisular (TF).

5. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados se pueden utilizar también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/300373; EP 03089]. Se considera que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

6. Diseño de la función efectora

65 Se puede desear modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora con el fin de aumentar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el residuo o residuos de cisteínas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis

mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf *et al.* Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis complementaria y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

7. Inmunocombinados

La presente invención también puede utilizar inmunocombinados que comprenden un anticuerpo combinado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunocombinados se han descrito anteriormente. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Existe un conjunto de radionúcleos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los combinados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la combinación de radionúcleos al anticuerpo. Ver WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo se puede combinar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcado de tumores en los que el combinado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de combinado no enlazado de la circulación utilizando un agente purificador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se combina a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúcleo).

8. Inmunoliposomas

Los anticuerpos descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77: 4030 (1980); y las Patentes U.S. Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la Patente U.S. No. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extraen a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden combinar a los liposomas tal y como se describen en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) mediante la reacción de intercambio de enlaces disulfuro. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina). Véase Gabizon *et al.*, J. Nacional Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

9. Composiciones farmacéuticas de anticuerpos

Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido IL-22 identificado en la presente invención, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos anteriormente en la presente invención, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos en forma de composiciones farmacéuticas.

Si el polipéptido IL-22 es intracelular y los anticuerpos completos se utilizan como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, se pueden utilizar también las lipofecciones o liposomas para liberar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

ES 2 316 454 T3

La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad particular en tratamiento, preferiblemente aquéllos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citoquina, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo deseado.

Los principios activos también se pueden introducir en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización por interfase, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

Las formulaciones a utilizar en la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre algunos ejemplos de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico no degradables, tales como el LUIL-22N DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante aproximadamente 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias razonables para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización apropiada de aditivos, y el desarrollo de composiciones de matrices de polímero específicas.

G. Utilizaciones de anticuerpos anti-IL-22

Los anticuerpos anti-IL-22 tienen varias utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-22 se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico para IL-22, por ejemplo, detectando su expresión (y en algunos casos, su expresión diferencial) en células específicas, tejidos o suero. Se pueden utilizar varias técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en el sector, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directo o indirecto y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) páginas 147-158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico se pueden marcar con un grupo detectable. El grupo detectable debería ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como alcalina fosfatasa, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al grupo detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter *et al.*, Nature, 144: 945 (1962); David *et al.*, Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain *et al.*, J. Immunol. Meth., 40: 219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407 (1982).

Los anticuerpos anti-IL-22 también son útiles para la purificación por afinidad de IL-22 a partir de un cultivo de células recombinantes o de origen natural. En este proceso, los anticuerpos contra IL-22 se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el IL-22 a purificar, y posteriormente se lava el soporte con un disolvente adecuado que extraerá sustancialmente todo el material en la muestra a excepción del IL-22, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el IL-22 del anticuerpo. Los anticuerpos anti-IL-22 también son útiles en la unión a IL-22 y, por tanto, inhibiendo, la expresión de PAP1, pueden aliviar la gravedad de los trastornos pancreáticos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con objetivos ilustrativos, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos de que se indique lo contrario. El origen de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo del documento, por los números de acceso de la ATCC, es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Ejemplo 1

Clonación de IL-22

5 Se identificó la Interleuquina-22 (DNA125185-2806) mediante la aplicación de un algoritmo de búsqueda de secuencia señal privado desarrollado por Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) sobre ESTs, así como fragmentos de EST agrupados y ensamblados a partir de bases de datos públicas (por ejemplo, GenBank) y/o privadas (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA). El algoritmo de secuencia señal calcula una puntuación de señal de secreción basada en el carácter de los nucleótidos de ADN que rodean el codón o codones de la primera metionina y
 10 opcionalmente la segunda metionina (ATG) en el extremo 5' de la secuencia o el fragmento de secuencia en consideración. Los oligonucleótidos siguientes al primer ATG deben codificar para por lo menos 35 aminoácidos inequívocos sin ningún codón de parada. Si el primer ATG tiene los aminoácidos requeridos, no se examina el segundo. Si ninguno cumple el requerimiento, no se puntúa la secuencia candidata. Con el fin de determinar si la secuencia de EST contiene una secuencia señal auténtica, se puntúan el ADN y las secuencias de aminoácidos correspondientes que rodean el
 15 codón ATG utilizando un equipo de siete sensores (parámetros de evaluación) conocidos por asociarse con señales de secreción.

El uso del algoritmo de secuencia señal descrito anteriormente permitió la identificación de una secuencia de grupos de EST de la base de datos Incyte, designada 5086173H1 en la presente invención. A continuación, se comparó
 20 esta secuencia de grupos de EST con un conjunto de bases de datos de marcadores de secuencia expresada (EST) que incluían bases de datos de EST públicas (por ejemplo, GenBank) y una base de datos de ADN de EST privada (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) para identificar homologías existentes. Se realizó la búsqueda por homología utilizando el programa informático BLAST o BLAST2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)). Se agruparon y ensamblaron aquellas comparaciones que daban lugar a una puntuación de BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o más que no codificaban proteínas conocidas en una secuencia de ADN de consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). En la presente invención se designa como DNA110880 a la secuencia de consenso obtenida de este modo.

En vista de la homología de secuencia observada entre la secuencia DNA110880 y una secuencia EST comprendida
 30 dentro del clon n° 5088384 a partir de la base de datos Incyte, se adquirió el clon n° 5088384 y se obtuvo y se secuenció el inserto de ADNc. En la presente invención se observó que este inserto de ADNc codificaba una proteína de longitud completa. En la Figura 1 se muestra la secuencia de este inserto de ADNc y en la presente invención se la designa como IL-22 (DNA125185-2806).

El clon DNA125185-2806 contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación traduccional
 35 aparente en las posiciones de nucleótidos 58-60 y de finalización en el codón de parada en las posiciones de nucleótidos 595-597 (Figura 1, SEC ID NO 1). El precursor de polipéptido previsto tiene 179 aminoácidos de largo (Figura 2, SEC ID NO: 2). La proteína IL-22 de longitud completa mostrada en la Figura 2 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 20.011 daltons y un pI de aproximadamente 8,10. El análisis de la secuencia de IL-22 de longitud
 40 completa mostrada en la Figura 2 (SEC ID NO:2) pone de manifiesto la presencia de una variedad de dominios de polipéptido importantes tal y como se muestra en la Figura 2, donde las localizaciones dadas para estos dominios de polipéptido importantes son aproximados tal y como se describe anteriormente. Se ha depositado IL-22 (DNA125185-2806) con ATCC el 7 de Diciembre de 1999 y se asignó el depósito de ATCC n° PTA-1031.

Ejemplo 2

Identificación de Interacciones Receptor/Ligando

En este ensayo, se evalúan varios polipéptidos IL-22 por la capacidad de unirse a un panel de potenciales moléculas
 50 receptoras o ligando con el propósito de identificar interacciones receptor/ligando. La identificación de un ligando para un receptor conocido, un receptor para un ligando conocido o una nueva pareja receptor/ligando es útil para un conjunto de indicaciones incluyendo, por ejemplo, el reconocimiento de moléculas bioactivas (enlazadas al ligando o al receptor) en una célula conocida por expresar el receptor o el ligando, el uso del receptor o el ligando como reactivo para detectar la presencia del ligando o receptor en una composición sospechosa de contener el mismo,
 55 donde la composición puede comprender células sospechosas de expresar el ligando o el receptor, la modulación del crecimiento u otra actividad biológica o inmunológica de una célula que se sabe que expresa o que responde al receptor o al ligando, la modulación de la respuesta inmune de células o hacia células que expresan el receptor o el ligando, permitir la preparación de agonistas, antagonistas y/o anticuerpos dirigidos contra el receptor o el ligando que modulará el crecimiento o una actividad biológica o inmunológica de una célula que expresa el receptor o el ligando,
 60 y otras diversas indicaciones que serán fácilmente evidentes para el experto habitual en la materia.

El ensayo se realiza de la siguiente manera. Se expresa un polipéptido IL-22 de la presente invención sospechoso de ser un ligando para un receptor como una proteína de fusión que contiene el dominio de Fc de IgG humana (una inmunoadhesina). Se detecta la unión receptor/ligando al permitir la interacción del polipéptido de inmunoadhesina
 65 con células (por ejemplo células Cos) que expresan receptores de polipéptidos IL-22 candidatos y la visualización de inmunoadhesina unida con reactivos fluorescentes dirigidos hacia el dominio de fusión de Fc y el examen mediante microscopio. Las células que expresan receptores candidatos se producen mediante la transfección transitoria, en paralelo, de subconjuntos definidos de una biblioteca de vectores de expresión de ADNc que codifican polipéptidos IL-22

ES 2 316 454 T3

que pueden funcionar como moléculas receptoras. A continuación, se incuban las células durante 1 hora en presencia de la inmunoadhesina de polipéptido IL-22 que está siendo evaluada por su posible unión receptora. A continuación, se lavan las células y se fijan con paraformaldehído. A continuación, se incuban las células con anticuerpo conjugado fluorescente dirigido contra la parte Fc de la inmunoadhesina de polipéptido IL-22 (por ejemplo, anticuerpo anti-Fc-humano de cabra conjugada con FITC). A continuación, se lavan otra vez las células y se examinan en el microscopio. Se considera una interacción positiva mediante la presencia de marcaje fluorescente de células transfectadas con ADNc que codifica un receptor de polipéptido IL-22 concreto o un conjunto de receptores y una ausencia de marcaje fluorescente similar de células preparadas de modo similar que se han transfectado con otro ADNc o conjuntos de ADNc. Si se considera positivo un conjunto definido de vectores de expresión de ADNc para la interacción con una inmunoadhesina de polipéptido de IL-22, se evalúan individualmente las muestras de ADNc individuales que comprenden el conjunto (el conjunto se “descompone”) para determinar el ADNc específico que codifica un receptor capaz de interactuar con la inmunoadhesina de polipéptido IL-22.

En otra realización de este ensayo, se permite que un potencial polipéptido IL-22 ligando etiquetado con un epítipo (por ejemplo una etiqueta de 8 histidinas “His”) interactúe con un panel de potenciales moléculas de polipéptido IL-22 receptoras que se han expresado como fusiones con el dominio de Fc de IgG humanas (inmunoadhesinas). Pasada una hora de co-incubación con el polipéptido IL-22 etiquetado con epítipo, se inmunoprecipitó cada uno de los receptores candidatos con partículas de proteína A y se lavaron las partículas. Se determina la interacción del ligando potencial mediante análisis de transferencia western de los complejos inmunoprecipitados con anticuerpo dirigido hacia la etiqueta epítipo. Se considera que tiene lugar una interacción si se observa una banda del peso molecular anticipado de la proteína etiquetada con epítipo en el análisis de transferencia western con un receptor candidato, pero no se observa que tenga lugar con los otros miembros del panel de receptores potenciales.

Utilizando estos ensayos, en la presente invención se han identificado las siguientes interacciones receptor/ligando:

1. IL-22 se une a IL-10R β . Figura 10 (SEC ID NO: 3)
 2. IL-22 se une a IL-22R. Figura 11 (SEC ID NO: 4)
- (Ver también [Xie *et al.*, J. Biol. Chem (2000) 275, 31335-31339]).

Ejemplo 3

Expresión de receptor de IL-22 en múltiples tejidos humanos

Se obtuvieron “blots” Northern de múltiples tejidos de Clontech (Palo Alto, CA). Se hibridaron estos “blots” con una sonda fabricada mediante el marcaje en el extremo de un oligonucleótido específico de receptor de IL-22 de 50 unidades utilizando 32P- γ ATP y T4 polipéptido quinasa. Se lavaron los “blots” 3 veces con 2XSSC/0,2% SDS y 1 vez con 0,2XSSC/0,1% SDS a 42°C. A continuación, se expusieron los “blots” a una película X-OMAT con pantallas intensificadoras durante 16 horas. Se muestra el resultado en la Figura 3. Esto muestra que el receptor de IL-22 es muy expresado en el páncreas, con un menor nivel de receptor IL-22 observado en el intestino delgado, el hígado, el riñón y el colon.

Ejemplo 4

Análisis TaqmanTM

Se obtuvo el ARN total mediante la homogenización de tejidos en tampón de lisis y se puso en capas el lisato sobre cloruro de cesio (CsCl 5,7 M/EDTA 50 mM) y se centrifugó a 35.000 X g durante 16 horas. A continuación, los residuos celulares se resuspendieron en agua sin ARNasa. A continuación, se utilizaron 50 nanogramos de ARN para realizar el análisis TaqmanTM. El valor de la expresión se estableció en relación con el gen de mantenimiento (“housekeeping”) GAPDH.

La reacción TaqManTM es una técnica fluorescente basada en PCR que utiliza la actividad de la 5' exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para controlar la amplificación a tiempo real. Se utilizan dos cebadores de oligonucleótidos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótido, o sonda, para detectar la secuencia de nucleótidos situada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extendible por la enzima Taq ADN polimerasa y está marcada con un colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente desactivador. Cualquier emisión inducida por láser procedente del colorante informador es desactivado por el colorante desactivante cuando los dos colorantes se localizan de manera próxima ya que están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa divide la sonda de manera dependiente con la plantilla. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en solución y la señal del colorante informador liberado está libre del efecto desactivador del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de colorante informador para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante informador no desactivado proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

ES 2 316 454 T3

Los resultados de la reacción de TaqMan™ se expresan como unidades delta (Δ) Ct. Los datos del ensayo TaqMan™ se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Éste se define como el ciclo en el que la señal informadora se acumula por encima del nivel base de fluorescencia. Los valores ΔCt se utilizan como medida cuantitativa del número relativo de copias de partida de una secuencia diana particular en una muestra de ácido nucleico cuando se comparan los resultados de cáncer con resultados humanos normales. Una unidad corresponde a 1 ciclo de PCR o a aproximadamente a una amplificación de 2 veces respecto a la normal; dos unidades corresponden a 4 veces; 3 unidades a una amplificación de 8 veces, etc. La cuantificación se obtuvo utilizando cebadores y una sonda fluorescente TaqMan™ derivada del gen que codifica el receptor de IL-22 (IL-22R). Las regiones de IL-22R que más probablemente contienen secuencias de ácido nucleico únicas y que menos probablemente tienen intrones ajustados (“spliced out”) son las preferidas para la derivación del cebador y la sonda, por ejemplo, regiones 3’ no traducidas. Las secuencias para los cebadores y las sondas (directa, inversa y sonda) utilizadas para el análisis de la amplificación del gen de IL-22R fueron las siguientes:

165608.tm.f1 (cebador directo)

5’TGCAACCTGACGGTGGAGA 3’ (SEC ID NO: 5)

165608.tm.r1 (cebador inverso)

5’AGAGAGCTGAACCTGTCAGTCATCTT 3’ (SEC ID NO: 6).

165608.tm.p1(sonda)

5’ CAGTGCGGGAGGCCGGTCA 3’ (SEC ID NO: 7)

El procedimiento de TaqMan™ se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativo a tiempo real, tal como el de ABI Prism 7700TM. El sistema consiste en un termociclador, un láser, una cámara de dispositivo acoplado a la carga (CCD) y un ordenador. El sistema amplifica las muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser se recoge a tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos, y se detecta en la CCD. El sistema incluye el programa para poner en marcha el instrumento y para analizar los datos.

La concentración de ARNm determinada por fluorimetría se utilizó a continuación para diluir cada muestra a 10 ng/μl en ddH₂O. Esto se realizó simultáneamente en todas las muestras de plantilla para un solo ensayo en placas TaqMan™, y con material suficiente para realizar diversos ensayos. Las muestras se analizaron por triplicado con cebadores TaqMan™ y sondas, tanto β-actina como GAPDH, en una sola placa con ARNm humano normal, sin añadir Transcriptasa Inversa y controles sin plantilla. La transcriptasa inversa utilizada fue SuperScript II (Life Technologies Inc., Grand Island, NY). La Taq Polimerasa, tampones y dNTPs fueron suministrados por Perkin Elmer (Perkin Elmer, Applied Biosystems División, Foster City, CA). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

a.	1 ciclo de:	Transcripción inversa	48°C,	30 minutos
b.	1 ciclo de:	Desnaturalizar	95°C,	10 minutos
c.	40 ciclos de:	Desnaturalizar	95°C,	30 segundos
		Extender	60°C,	90 segundos

Resultados

Los resultados de esto se muestran en la figura 4. El receptor de interleuquina-22 se expresó mayoritariamente en el páncreas, detectando expresión en hígado fetal, hígado adulto, riñón, intestino y colon.

Ejemplo 5

Activación de STAT en células acinares pancreáticas

266-6 es una línea celular derivada de células acinares pancreáticas de ratón y se obtuvo de ATCC (depósito de ATCC N° CRL-2151). Se cultivaron estas células en DMEM complementado con 10% FBS penicilina/estreptomina y L-glutamina 2 mM (Life Technologies Gaithersburg, MD) y se mantuvieron en una cámara humidificada con CO₂ al 5%. Se estimularon las células 266-6 con control de IL-22 de ratón etiquetado con his que contenía sobrenadante de baculovirus (10% vol/vol) durante 10 minutos a 37°C. Se prepararon lisatos celulares y se realizaron ensayos por desplazamiento en gel. Se adquirieron anticuerpos utilizados para experimentos de superdesplazamiento (“supershift”)

ES 2 316 454 T3

de STAT en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Las proteínas de unión a STAT inducidas por IL-22 murino podían superdesplazarse con anticuerpos hasta STAT 3, tal y como se muestra en la Figura 5. Esto demuestra que la línea celular acinar pancreática 266-6 responde a IL-22 murino mediante la activación del mecanismo de Janus Kinase (JAK-STAT), y a través de STAT3 específicamente. La línea celular beta pancreática (NIT-1), no utiliza el mecanismo JAK-STAT (no se muestran datos).

Ejemplo 6

IL-22 incrementa la expresión de la Proteína Asociada a Pancreatitis (PAP1)

La Proteína Asociada a la Pancreatitis (PAP1) es una proteína secretada y se sobreexpresa en la pancreatitis aguda, con niveles de expresión casi completamente ausentes en páncreas normales [Iovanna *et al.*, J Biol Chem.(1991), 266, 24664-24669]. Se desconoce la función exacta de PAP1, aunque está relacionada estructuralmente con el dominio de reconocimiento de carbohidratos de lectinas tipo c y es un miembro de la familia de moléculas REG. Algunos documentos han sugerido actividades tróficas para los miembros de la familia REG [Nishimune *et al.*, (2000) Nat Cell Biol 2(12), 906-14]. La inducción de PAP1 con otras citoquinas, tales como IL-1 ó IL-6, tanto solos como combinados, no han conseguido regular por incremento PAP1 [Duseti *et al.*, (1995) J. Biol Chem 270., 22417-22421]. Se observan niveles incrementados en suero de PAP1 en pacientes con enfermedad Celíaca, [Carroccio *et al.*, (1997) Digestion 58, 98-103] un trastorno del intestino delgado, y en pacientes con fibrosis quística [Iovanna *et al.*, (1994) C.R. Acad. Sci 317, 561-564].

Se trataron células 266-6 con IL-22 murino etiquetado con his purificado durante 6 horas. Se extrajo el ARN total mediante la homogenización de las células en tampón de lisis y la formación de capas de los lisatos celulares de cloruro de cesio (5,7 M CsCl/50 mM EDTA). Se centrifugaron los lisatos celulares a 35.000 X g durante 16 horas. Se resuspendieron los residuos celulares en agua sin ARNm. Se resolvieron 20 microgramos de ARN utilizando un gel desnaturante de formaldehído y se transfirieron a membranas de celulosa. Se realizó la hibridación utilizando una sonda de oligonucleótido marcada con ^{32}P - γ ATP específica de PAP1. Se lavaron los "blots" 3 veces con 2X SSC/0,2% SDS y 1 vez con 0,2XSSC/0,1% SDS a 42°C. Se expusieron los "blots" a una película X-OMAT con pantallas intensificadoras durante 16 horas. A continuación, se deshicieron los "blots" y se resonaron utilizando una sonda de oligonucleótido específico de GAPDH marcada con ^{32}P - γ ATP. Este resultado se muestra en la Figura 6A. La incubación de las células 266-6 con IL-22 murino dio lugar a una inducción espectacular de la expresión de gen de PAP1. Para determinar si las células acinares pancreáticas primarias también son capaces de responder al IL-22 murino, se aislaron células acinares primarias de páncreas de ratón mediante digestión con colagenasa y se incubaron durante 6 horas con o sin IL-22 murino purificado. Se preparó ARN tal y como se describe anteriormente y se examinó la expresión de PAP1. Del mismo modo que con la línea celular 266-6, el IL-22 murino indujo una regulación por incremento sustancial de la expresión de PAP1 en las células acinares pancreáticas primarias aisladas.

Ejemplo 7

IL-22 induce la expresión del gen de PAP1 in vivo

Con el fin de examinar los efectos de IL-22 murino *in vivo*, a tres grupos de ratones se inyectaron intraperitonealmente 25 microgramos de IL-22 murino o PBS. Los ratones se recogieron a las 2, 6 ó 24 horas después de la inyección y se extrajeron sus páncreas y se congelaron rápidamente. Se preparó el ARN de este tejido y se realizó un análisis de transferencia Northern, tal y como se describe en el Ejemplo 5 utilizando una sonda específica del gen de PAP1. Tal como se muestra en la figura 7, PAP1 se reguló por incremento en las dos primeras horas después de la inyección de IL-2 murino, alcanzando una expresión máxima en aproximadamente 6 horas y aún estaba inducida a las 24 horas.

Ejemplo 8

Respuesta pancreática de IL-22

Para confirmar que la respuesta de páncreas observada era debido a la señalización mediada por el receptor de IL-22 en lugar de una toxicidad no específica de la proteína recombinante, se inyectó mL-22 en ratones deficientes de IL-10R β (-/-). Estos ratones carecen de una cadena funcional del complejo IL-10R β /IL-22R para la señalización de IL-22. Previamente se describió que los ratones deficientes de IL-10R β carecían de sensibilidad a IL-10. Los monocitos esplénicos aislados de ratones deficientes de IL-10R β no muestran una inhibición mediada por IL-10 de la secreción de IL-6 inducida por lipopolisacáridos (LPS) (figura 8) o TNF-alfa (no mostrado). Tal como se ha indicado previamente, IL-22 parece que no afecta a la respuesta de monocitos a LPS (Xie *et al.*, (2000) J. Biol. Chem., 275, 31335-31339). IL-22 no parece afectar a la respuesta de monocitos a LPS.

Ejemplo 9

Respuesta de IL-22 en ratones deficientes de IL-10R β

Los ratones que son deficientes o "knocked out" de IL-10R β , carecen de una cadena funcional del complejo receptor IL-22R/IL-10R β necesario para la señalización de IL-22, y previamente se describió que los ratones deficientes de IL-10R β carecían de sensibilidad a IL-10. A ratones deficientes de IL-10R β y ratones de tipo salvaje se inyectaron

ES 2 316 454 T3

intraperitonealmente con o sin IL-22 murino y se recogieron 16 horas después de la inyección y se realizó un análisis de transferencia Northern sobre el ARN pancreático utilizando sondas de PAP1 tal y como se describe previamente. Dado que los ratones IL-10R β carecen de una de las cadenas necesarias para transducir una señal intracelular, no había una inducción de PAP1 evidente tal y como se muestra en la figura 9. En cambio, los ratones de tipo salvaje mostraron una fuerte inducción de expresión de PAP1 también mostrada en la figura 9.

Ejemplo 10

Utilización de IL-22 como sonda de hibridación

El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica IL-22 como sonda de hibridación.

El ADN que comprende la secuencia codificante de IL-22 de longitud completa o madura tal y como se describe en la presente invención, se utiliza como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de IL-22) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de astringencia elevada. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada de IL-22 a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad en la secuencia deseada con el ADN que codifica el IL-22 de secuencia nativa de longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en la literatura.

Ejemplo 11

*Expresión de IL-22 en *E. coli**

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de IL-22 mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica IL-22 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción del vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar un conjunto de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar *et. al.*, Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se defosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor trp, una secuencia líder de polihis (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia polihis, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante de IL-22, el finalizador transcripcional lambda, y un gen argU.

A continuación, la mezcla de unión se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los procedimientos descritos en Sambrook *et. al.*, *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y, a continuación, se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plásmido se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

Los clones seleccionados se pueden desarrollar durante toda la noche en un medio de cultivo líquido, tal como caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante la cual se activa el promotor de la expresión.

Después de cultivar las células durante más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El residuo celular obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica y, a continuación, la proteína IL-22 solubilizada se puede purificar utilizando una columna quelante metálica en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

El IL-22 puede expresarse en *E. coli* en forma de etiqueta de poli-His, utilizando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica IL-22 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios para enzimas de restricción que se corresponden con los sitios para enzimas de restricción del vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan una iniciación de la traducción eficaz y fiable, una purificación rápida en una columna quelante metálica, y la extracción proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His amplificadas por PCR se unen a continuación en un vector de expresión que se utiliza para transformar un *E. coli* huésped basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) Ion galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se cultivan en primer lugar en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta alcanzar una D.O. 600 de 3-5. Los cultivos se diluyen a continuación 50-100 veces en un medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de sodio-2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura

ES 2 316 454 T3

Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, además de 110 mM de MPOS, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y 7 mM de MgSO₄) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se extraen para verificar la expresión mediante un análisis SDS-PAGE, y el volumen del cultivo se centrifuga hasta que las células son residuos de centrifugación. Los residuos celulares se congelan hasta la purificación y el repliegue.

5 La masa de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 L (6-10 g de residuos celulares) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) de 7 M de guanidina, 20 mM de Tris, tampón de pH 8. Se añade sulfito sódico sólido y tetratiónato de sodio para que las concentraciones finales sean de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante toda la noche a 4°C. Esta etapa da lugar a una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm durante 30 minutos en una ultracentrífuga Beckman. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante metálica (6 M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micras para aclarar. El extracto purificado se carga en una columna quelante metálica Qiagen Ni-NTA de 5 ml equilibrada con el tampón de columna quelante metálica. La columna se lava con un tampón adicional que contiene 50 mM de imidazol (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con un tampón que contiene 250 mM de imidazol. Las fracciones que contienen la proteína de interés se agrupan y se guardan a 4°C. La concentración de la proteína se estima según su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

20 Las proteínas se repliegan mediante la dilución lenta de la muestra en tampón de repliegue preparado nuevo consistente en: 20 mM de Tris, pH 8,6, 0,3 M de NaCl, 2,5 M de urea, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina y 1 mM de EDTA. Los volúmenes de repliegue se escogen de manera que la concentración final de proteína está entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de repliegue se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de repliegue se desactiva mediante la adición de TFA hasta una concentración final del 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de otra purificación de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micras y se añade acetonitrilo hasta una concentración final del 2-10%. La proteína plegada se somete a una columna de cromatografía de fase inversa Poros R1/H utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Las alcuotas de fracciones con una absorbancia A280 se analizan en geles de SDS poliacrilamida y las fracciones que contienen proteína plegada homogénea se agrupan. Generalmente, las muestras plegadas correctamente de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que esas muestras son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las muestras agregadas se eluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de solucionar las formas mal plegadas de proteínas de la manera deseada, la etapa de la fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

35 Las fracciones que contienen el polipéptido IL-22 plegado deseado se agrupan y se elimina el acetonitrilo utilizando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en 20 mM Hepes, pH 6,8 con 0,14 M de cloruro sódico y manitol al 4% por diálisis o por filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas estériles.

40 Muchos de los polipéptidos IL-22 descritos en la presente invención se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 12

Expresión de IL-22 en células de mamíferos

45 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de IL-22 mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

50 El vector pRK5 (véase EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de IL-22 está unido en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de IL-22 utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook *et. al.*, *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-IL-22.

55 En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se desarrollan para unirse en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-IL-22 con 1 µg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmappaya *et. al.*, Cell, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de CaCl₂. A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO₄, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio nuevo y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

65 Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de 35S-cisteína y 200 µCi/ml de 35S-metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de giro y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para

ES 2 316 454 T3

revelar la presencia del polipéptido IL-22. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

5 En una técnica alternativa, se puede introducir IL-22 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac *et. al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un frasco giratorio y se añaden 700 μg de ADN de pRK5-IL-22. En primer lugar, las células se concentran a partir del frasco giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba sobre el residuo celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el frasco giratorio que contiene el medio de cultivo de tejido, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina bovina y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los debris. La muestra que contiene el IL-22 expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

15 En otra realización, el IL-22 puede expresarse en células CHO. El pRK5-IL-22 puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio puede reemplazarse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como la 35S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido IL-22, el medio de cultivo puede reemplazarse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio acondicionado. A continuación, el medio que contiene el IL-22 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

25 El IL-22 etiquetado con epítipo puede expresarse también en células CHO huésped. El IL-22 puede subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclon puede experimentar PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta de epítipo seleccionada, tal como una etiqueta de poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. El inserto de IL-22 etiquetado con poli-his puede subclonarse a continuación en un vector conductor SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal y como se describe anteriormente) con el vector conductor SV40. El marcaje puede realizarse, tal y como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el IL-22 etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelante-Ni²⁺.

35 El IL-22 puede expresarse también en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

40 La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, CH₂ y los dominios de CH₂ y/o es una forma etiquetada de poli-his.

45 Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar descritas en Ausubel *et. al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el transporte adecuado de los ADNs. El vector utilizado en la expresión en las células CHO es tal y como se describe en Lucas *et. al.*, Nucl. Acid Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADN de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

50 Se introducen doce microgramos del ADN plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección Superfect[®] (Quiagen), Dosp[®] o Fugene[®] (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se desarrollan tal y como se describe en Lucas *et. al.*, *supra*. Se congelan aproximadamente 3×10^{-7} células en una ampolla para un crecimiento y producción posterior tal y como se describe a continuación.

55 Las ampollas que contienen el ADN plásmido se descongelan colocándolas en un baño de agua y se mezclan mediante centrifugación. El contenido se pipetea en un tubo de centrifuga que contiene 10 mL de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 μm con un 5% de suero bovino fetal dialfiltrado a 0,2 μm). A continuación, las células se fraccionan en un centrifugador de 100 mL que contiene 90 mL del medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren a un centrifugador de 250 mL lleno con 150 mL de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C. Después de otros 2-3 días, se siembran centrifugadores de 250 mL, 500 mL y 2000 mL con 3×10^5 células/mL. El medio celular se cambia por medio nuevo mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio de CHO adecuado, en realidad se puede utilizar un medio de producción descrito en la patente estadounidense No. 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. Se siembra un centrifugador de 3 L de producción hasta $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determina el pH del número de células. En el día 1, se toman muestras en el centrifugador y se inicia el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se toman muestras en el centrifugador, la temperatura se cambia a 33°C, y se toman 30 mL de glucosa a 500 g/L y 0,6 mL de antiespuma al 10% (por ejemplo 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajusta según la necesidad manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la

ES 2 316 454 T3

viabilidad cae por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μm . El filtrado se guarda a 4°C o se carga inmediatamente en columnas para la purificación.

5 Para las construcciones etiquetadas con poli-his, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4°C. Tras cargarse, la columna se lava con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con el tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que
10 contiene 10 mM Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guarda a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir del medio acondicionado tal y como se indica a continuación. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A (Pharmacia) de 5
15 ml que ha sido equilibrada en un tampón de 20 mM de fosfato sódico, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluída se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μL de tampón de Tris 1M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento, tal como el descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-his. La homogeneidad se calcula mediante geles de
20 poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales mediante degradación Edman.

Muchos de los polipéptidos IL-22 descritos en la presente invención se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

25 Ejemplo 13

Expresión de IL-22 en levadura

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de IL-22 en levadura.

30 En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de IL-22 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica IL-22 y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de IL-22. Para la secreción, el ADN que codifica IL-22 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica
35 el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de IL-22 nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, una secuencia señal/líder de factor alfa de levadura o la secuencia señal/líder secretora de la invertasa, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de IL-22.

Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con los
40 plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

El IL-22 recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura
45 del medio de fermentación mediante la centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene IL-22 puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna concretas.

Muchos de los polipéptidos IL-22 descritos en la presente invención se expresaron de forma satisfactoria tal y
50 como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 14

Expresión de IL-22 en células de insecto infectadas de Baculovirus

55 El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de IL-22 en células de insecto infectadas de Baculovirus.

La secuencia que codifica IL-22 se fusiona en dirección 5' a un epítipo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichas epítipo etiquetas incluyen etiquetas de poli-his y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de 1gG). Pueden utilizarse un conjunto de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica IL-22 o la parte deseada de la secuencia que codifica IL-22, tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína extracelular se amplifica mediante
60 PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con todas esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

ES 2 316 454 T3

El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (PharMingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como describe en O'Reilley *et. al.*, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

A continuación, el IL-22 etiquetado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con Ni²⁺-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert *et. al.*, *Nature*, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 a 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonica dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se purifican por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 mL por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A280 con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato; 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye las proteínas unidas no específicamente. Después de alcanzar de nuevo la línea base a A280, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un mL y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni²⁺-NTA conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen IL-22 etiquetado con His10 eluido se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

Alternativamente, la purificación del IL-22 etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

Muchos de los polipéptidos IL-22 descritos en la presente invención se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 15

Preparación de anticuerpos que se unen a IL-22

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a IL-22.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen IL-22 purificado, proteínas de fusión que contienen IL-22, y células que expresan IL-22 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse según el técnico en la materia sin una gran experimentación.

Los ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de IL-22 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados a continuación son reforzados 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante diversas semanas, los ratones también se pueden reforzar con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-IL-22.

Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales "positivos" para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de IL-22. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionada, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA por la reactividad contra IL-22. La determinación de células de hibridomas "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra IL-22 está dentro de la técnica.

Las células de hibridomas positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones singéneos Balb/c para producir ascites que contienen anticuerpos monoclonales anti-IL-22. Alternativamente, las células de hibridomas pueden desarrollarse en matraces de cultivos de tejidos o en botellas en rodillo. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los ascites se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

Ejemplo 16

Purificación de polipéptidos IL-22 usando Anticuerpos Específicos

5 Los polipéptidos IL-22 nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en el campo de purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifica el polipéptido pro-IL-22, el polipéptido IL-22 maduro, o el polipéptido pre-IL-22 mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido IL-22 de interés. En general, se construye una columna de inmunoafinidad mediante acoplamiento covalentes de anticuerpos de anti-polipéptido IL-22 a una resina de cromatografía activada.

10 Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en la Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J). Asimismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de los fluidos de ascites de ratón mediante la precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica, tal como la SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Dicha columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido IL-22 mediante la preparación de una fracción a partir de células que contienen polipéptido IL-22 en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de toda la célula o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por adición de detergente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido IL-22 soluble que contiene una secuencia señal podría secretarse en una cantidad útil en el medio en el que las células crecen.

25 Una preparación que contiene polipéptido IL-22 soluble se pasa por la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorbancia preferencial del polipéptido IL-22 (por ejemplo, tampones de fuerza iónica elevada en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que rompen la unión anticuerpo/polipéptido IL-22 (por ejemplo, un tampón de pH bajo, tal como aproximadamente un pH de 2-3, o una alta concentración de caótropro, tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido IL-22.

30 Ejemplo 17

Cribado de fármacos

35 La presente invención es particularmente útil para cribar compuestos mediante la utilización de polipéptidos IL-22 o fragmentos de unión de los mismos en cualquiera de un conjunto de técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido IL-22 o el fragmento utilizado en dicha prueba puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, adsorbido en una superficie celular o situado intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármaco utiliza células huésped eucariotas o procariotas, las cuales se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido IL-22 o un fragmento. Los fármacos se criban contra dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, tanto en forma viable como fija, se pueden utilizar para ensayos de unión estándar. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido IL-22 o un fragmento y el agente que se está probando. Alternativamente, se puede examinar la disminución en la formación del complejo entre el polipéptido IL-22 y su célula diana o receptores diana causada por el agente que se está probando.

45 De este modo, la presente invención proporciona procedimientos de cribado para fármacos o cualquier otro agente que puede afectar a una enfermedad o un trastorno asociados al polipéptido IL-22. Estos procedimientos comprenden el contacto de dicho agente con un polipéptido IL-22 o fragmento del mismo y el ensayo (I) de la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido IL-22 o un fragmento, o (II) de la presencia de un complejo entre el polipéptido IL-22 o un fragmento y la célula, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En dichos ensayos de unión competitiva, el polipéptido IL-22 o un fragmento están normalmente marcados. Después de una incubación adecuada, el polipéptido IL-22 o un fragmento libres se separan de la forma unida, y la cantidad de marca libre o no complejada es una medida de la capacidad del agente concreto para unirse al polipéptido IL-22 o para interferir en el complejo polipéptido IL-22/célula.

55 Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona un cribado de alto rendimiento de compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a un polipéptido y se describe en detalle en WO 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. Brevemente, una gran cantidad de compuestos de diferentes péptidos pequeños de prueba se sintetizan en un sustrato sólido, tal como agujas de plástico o alguna otra superficie. Tal y como se aplica a un polipéptido IL-22, las compuestos de péptidos de prueba se hacen reaccionar con polipéptido IL-22 y se lavan. Se detecta el polipéptido IL-22 unido mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. El polipéptido IL-22 purificado también puede recubrirse directamente en placas para utilizar en las técnicas de cribado de fármacos mencionadas anteriormente. Además, se pueden utilizar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

65 La presente invención también contempla la utilización de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los cuales los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a polipéptidos IL-22 compiten específicamente con un compuesto de prueba para unirse a polipéptido IL-22 o fragmentos del mismo. De esta manera, pueden utilizarse anticuerpos para

detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido IL-22.

Ejemplo 18

5

Diseño racional de fármacos

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés (es decir, un polipéptido IL-22) o de pequeñas moléculas con las cuales interaccionan, por ejemplo, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se puede utilizar para crear fármacos que son formas más activas o estables del polipéptido IL-22 o que potencian o interfieren con la función del polipéptido IL-22 *in vivo* (c.f. Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

En una estrategia, se determina la estructura tridimensional del polipéptido IL-22, o de un complejo polipéptido IL-22-inhibidor, mediante cristalografía de rayos X, mediante modelación por ordenador o, más habitualmente, mediante una combinación de las dos estrategias. Deben comprobarse la forma y las cargas del polipéptido IL-22 para elucidar la estructura y para determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Con menor frecuencia, podría obtenerse la información útil con respecto a la estructura del polipéptido IL-22 mediante la modelación basada en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural pertinente se utiliza para diseñar moléculas análogas de tipo polipéptido IL-22 o para identificar inhibidores eficaces. Entre los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos se pueden incluir moléculas que han mejorado la actividad o la estabilidad, tal como se muestra por Braxton y Wells, *Biochemistry*, 31: 7796-7801 (1992) o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos tal y como se muestra por Athauda *et. al.*, *J. Biochem.*, 113: 742-746 (1993).

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado mediante un ensayo funcional, tal y como se ha descrito anteriormente y, a continuación solucionar su estructura cristalina. Esta estrategia, en principio, produce un profármaco en el que puede basarse el diseño de fármacos posterior. Es posible evitar una cristalografía de toda la proteína mediante la generación de anticuerpos anti-idiotípico (anti-ids) a un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, se esperaría que el sitio de unión del anti-ids sería un análogo del receptor original. A continuación, el anti-ids podría utilizarse para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actuarían entonces como el profármaco.

En virtud de la presente invención, se pueden fabricar cantidades suficientes del polipéptido IL-22 para realizar estudios analíticos, tales como la cristalografía de rayos-X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-22 proporcionada en la presente invención proporcionará una guía para los usuarios de técnicas de modelación por ordenador en lugar de o adicionalmente a la cristalografía de rayos-X.

Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
DNA125185-2806	PTA-1031	7 de diciembre de 1999

Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente reemplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

La memoria escrita anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención y otras construcciones

ES 2 316 454 T3

que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones. El depósito del material de la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, las diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

15 Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0024758 A [0007]
- WO 9311161 A [0054]
- US 5364934 A [0067]
- US 4640835 A [0081]
- US 4301144 A [0081]
- US 4791192 A [0081]
- US 5428130 A [0084]
- US 4399216 A [0092]
- US 4946783 A [0093]
- US 4943529 A [0094]
- EP 183070 A [0094]
- EP 394538 A [0094]
- US 5010182 A [0097]
- WO 9013646 A [0097]
- EP 73657 A [0103]
- EP 117060 A [0107]
- WO 9106629 A [0116]
- WO 9013641 A [0118]
- WO 9010448 A [0120]
- US 4870009 A [0125]
- US 5206344 A [0134]
- WO 9733551 A [0146] [0147]
- US 4816567 A [0158] [0158] [0162]
- US 5545807 A [0163]
- US 5569825 A [0163]
- EP 404097 A [0054]
- US 4275149 A [0058]
- WO 8705330 A [0079]
- US 4496689 A [0081]
- US 4670417 A [0081]
- US 4179337 A [0081]
- WO 8905859 A [0092]
- DD 266710 [0093]
- EP 139383 A [0094]
- EP 402226 A [0094]
- EP 244234 A [0094]
- WO 9100357 A [0094]
- EP 362179 A [0097]
- EP 36776 A [0101]
- GB 2211504 A [0104]
- EP 117058 A [0107]
- WO 9010048 A [0117]
- WO 9104753 A [0119]
- US 4736866 A [0125]
- US 4657760 A [0134]
- US 5225212 A [0134]
- US 5545806 A [0163]
- US 5625126 A [0163]

ES 2 316 454 T3

- US 5633425 A [0163]
- WO 9308829 A [0166]
- 5 • US 4676980 A [0173] [0173]
- WO 9100360 A [0173]
- EP 03089 A [0173]
- 10 • US 4485045 A [0178]
- US 5013556 A [0178]
- 15 • EP 307247 A [0226]
- WO 8403564 A [0263]
- US 5661016 A [0163]
- WO 9627011 A [0168]
- WO 92200373 A [0173]
- WO 9411026 A [0176]
- US 4544545 A [0178]
- US 3773919 A [0185]
- US 5122469 A [0236]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 20 • **NOMURA** *et al.* *Ultra. Path.*, 1992, vol. 16, 317-32 [0005]
- **XIE** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 31335-31339 [0006] [0209]
- 25 • **IOVANNA** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 24664-24669 [0006]
- **DUMONTIER** *et al.* *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 1814-1819 [0007]
- **NIELSEN** *et al.* *Prot. Eng.*, 1997, vol. 10, 1-6 [0015]
- 30 • **VON HEINJE** *et al.* *Nucl. Acids. Res.*, 1986, vol. 14, 4683-4690 [0015]
- **ALTSCHUL** *et al.* *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0019] [0026]
- 35 • **ALTSCHUL** *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0020] [0027]
- **SAMBROOK** *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press*, 1989 [0037]
- **IOVANNA** *et al.* *J Biol Chem.*, 1991, vol. 266, 24664-24669 [0040] [0206]
- 40 • **ZAPATA** *et al.* *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0047]
- **PLUCKTHUN**. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag*, 1994, vol. 113, 269-315 [0053]
- 45 • **HOLLINGER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0054] [0171]
- **CUNNINGHAM; WELLS**. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0074]
- **CREIGHTON**. *The Proteins. W.H. Freeman & Co*, [0074]
- 50 • **CHOTHIA**. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0074]
- **T.E. CREIGHTON**. *Proteins: Structure and Molecular Properties. W.H. Freeman & Co*, 1983, 79-86 [0076]
- 55 • **APLIN; WRISTON**. *CRC (Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0079]
- **HAKIMUDDIN** *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0080]
- **EDGE** *et al.* *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0080]
- 60 • **THOTAKURA** *et al.* *Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0080]
- **FIELD** *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2165 [0083]
- 65 • **EVAN** *et al.* *Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0083]
- **PABORSKY** *et al.* *Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0083]

ES 2 316 454 T3

- **HOPP** *et al.* *Bio Technology*, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0083]
- **MARTIN** *et al.* *Science*, 1992, vol. 255, 192-194 [0083]
- 5 • **SKINNER** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0083]
- **LUTZ-FREYERMUTH** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0083]
- **STEWART** *et al.* Solid-Phase peptide Synthesis. W.H. Freeman Co, 1969 [0085]
- 10 • **MERRIFIELD**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0085]
- **SAMBROOK** *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989
- 15 • **DIEFFENBACH** *et al.* PCR Primer: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1995 [0087]
- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. IRL Press, 1991 [0091]
- **SHAW** *et al.* *Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0092]
- 20 • **GRAHAM; VAN DER EB**. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0092]
- **VAN SOLINGEN** *et al.* *J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0092]
- 25 • **HSIAO** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0092]
- **KEOWN** *et al.* *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0092]
- **MANSOUR** *et al.* *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0092]
- 30 • **BEACH; NURSE**. *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0094]
- **FLEER** *et al.* *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0094]
- 35 • **LOUVENCOURT** *et al.* *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154 (2), 737-742 [0094]
- **VAN DEN BERG** *et al.* *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0094]
- **SREEKRISHNA** *et al.* *J. Basic Microbiol.*, 1988, vol. 28, 265-278 [0094]
- 40 • **CASE** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0094]
- **BALLANCE** *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0094]
- 45 • **TILBURN** *et al.* *Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0094]
- **YELTON** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0094]
- **KELLY; HYNES**. *EMBOJ.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0094]
- 50 • **C. ANTHONY**. *The Biochemistry of Methylotrophs*, 1982, 269 [0094]
- **GRAHAM** *et al.* *J. Gen. Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0095]
- 55 • **URLAUB; CHASIN**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0095]
- **MATHER**. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0095]
- **URLAUB** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0100]
- 60 • **STINCHCOMB** *et al.* *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0100]
- **KINGSMAN** *et al.* *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0100]
- 65 • **TSCHEMPER** *et al.* *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0100]
- **JONES**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0100]

ES 2 316 454 T3

- **CHANG** *et al. Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0101]
- **GOEDEL** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0101]
- 5 • **GOEDEL**. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0101]
- **DEBOERET**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0101]
- **HITZEMAN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0102]
- 10 • **HESS** *et al. J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0102]
- **HOLLAND**. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0102]
- 15 • **GETHING** *et al. Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0107]
- **MANTEI** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0107]
- **THOMAS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0108]
- 20 • **DEUTSCHER**. *Methods in Enzymology*, 1990, 182 [0111]
- **SCOPES**. Protein Purification: Principles and Practice. *Springer-Verlag*, 1982 [0111]
- 25 • **STEIN; COHEN**. *Cancer Res.*, 1988, vol. 48, 2659 [0115]
- **VAN DER KROL** *et al. Bio Techniques*, 1988, vol. 6, 958 [0115]
- **THOMAS; CAPECCHI**. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0126]
- 30 • **LI** *et al. Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0126]
- **BRADLEY**. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. IRL, 1987, 113-152 [0126]
- 35 • **ZAMECNIK** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 4143-4146 [0127]
- **DZAU** *et al. Trends in Biotechnology*, 1993, vol. 11, 205-210 [0128]
- **WU** *et al. J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0128]
- 40 • **WAGNER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0128]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0129]
- 45 • **MORDENTI, J.; CHAPPELL, W.** *et al.* The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development. *Pergamon Press*, 1989, 42-96 [0133]
- **FIELDS; SONG**. *Nature (London)*, 1989, vol. 340, 245-246 [0139]
- 50 • **CHIEN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0139]
- **CHEVRAY; NATHANS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 89, 5789-5793 [0139]
- **COLIGAN** *et al. Current Protocols in Immun.* 1991, vol. 1 [0141]
- 55 • **LEE** *et al. Nucl. Acids Res.*, 1979, vol. 6, 3073 [0144]
- **COONEY** *et al. Science*, 1988, vol. 241, 456 [0144]
- 60 • **DERVAN** *et al. Science*, 1991, vol. 251, 1360 [0144]
- **OKANO**. *Neurochem.*, 1991, vol. 56, 560 [0144]
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression. *CRC Press*, 1988 [0144]
- 65 • **ROSSI**. *Current Biology*, 1994, vol. 4, 469-471 [0146]
- **KOHLER; MILSTEIN**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0152]

ES 2 316 454 T3

- **GODING**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0153]
- **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0154]
- 5 • **BRODEUR et al.** Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. *Marcel Dekker, Inc.*, 1987, 51-63 [0154]
- **MUNSON; POLLARD**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0155]
- 10 • **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0161]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0161]
- **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0161]
- 15 • **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0162]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0162]
- 20 • **HOOGENBOOM; WINTER**. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0163]
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0163]
- **COLE et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, 1985, 77 [0163]
- 25 • **BOEMER et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95
- **MARKS et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0163]
- 30 • **LONBERG et al.** *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0163]
- **MORRISON**. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0163]
- **FISHWILD et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0163]
- 35 • **NEUBERGER**. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0163]
- **LONBERG; HUSZAR**. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0163]
- 40 • **MILSTEIN; CUELLO**. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0166]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0166]
- **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0167]
- 45 • **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0169]
- **SHALABY et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0170]
- 50 • **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0171]
- **GRUBER et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0171]
- **TUTT et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0171]
- 55 • **CARON et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0174]
- **SHOPES**. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2919-2922 [0174]
- 60 • **WOLFF et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0174]
- **STEVENSON et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0174]
- **VITETTA et al.** *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0176]
- 65 • **EPSTEIN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0178]
- **HWANG et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0178]

ES 2 316 454 T3

- **MARTIN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0179]
- **GABIZON** *et al. J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0179]
- 5 • **MARASCO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0181]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences* [0183]
- **ZOLA**. *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press*, 1987, 147-158 [0186]
- 10 • **HUNTER** *et al. Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0186]
- **DAVID** *et al. Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014 [0186]
- 15 • **PAIN** *et al. J. Immunol. Meth.*, 1981, vol. 40, 219 [0186]
- **NYGREN**. *J. Histochem, and Cytochem*, 1982, vol. 30, 407 [0186]
- **ALTSHUL** *et al. Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0191]
- 20 • **XIE** *et al. J. Biol. Chem*, 2000, vol. 275, 31335-31339
- **NISHIMUNE** *et al. Nat Cell Biol*, 2000, vol. 2 (12), 906-14 [0206]
- 25 • **DUSETTI** *et al. J. Biol Chem*, 1995, vol. 270, 22417-22421 [0206]
- **CARROCCIO** *et al. Digestion*, 1997, vol. 58, 98-103 [0206]
- **IOVANNA** *et al. C.R. Acad. Sci*, 1994, vol. 317, 561-564 [0206]
- 30 • **BOLIVAR** *et al. Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0216]
- **THIMMAPPAYA** *et al. Cell*, 1982, vol. 31, 543 [0227]
- 35 • **SOMPARYRAC** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 12, 7575 [0229]
- **AUSUBEL** *et al. Current Protocols of Molecular Biology. John Wiley and Sons*, 1997 [0234]
- **LUCAS** *et al. Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24 (9), 1774-1779 [0234]
- 40 • **O'REILLEY** *et al. Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. Oxford University Press*, 1994 [0247]
- **BRAXTON; WELLS**. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 7796-7801 [0266]
- 45 • **ATHAUDA** *et al. J. Biochem.*, 1993, vol. 113, 742-746 [0266].

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de inhibición de la expresión inducida por IL-22 de PAP1 por células pancreáticas en un sistema que comprende dichas células, comprendiendo dicho método poner en contacto dicho sistema *in vitro* con un anticuerpo antagonista de IL-22 inhibiéndose de este modo dicha expresión de PAP1 por dichas células pancreáticas, en el que IL-22 es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID No. 2), con o sin el péptido señal.
- 10 2. Uso de un anticuerpo antagonista de IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un trastorno pancreático en un mamífero.
- 15 3. Uso según la reivindicación 2, en el que el trastorno pancreático es pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, carcinoma pancreático, incluyendo carcinoma de células acinares o carcinoma pancreático de una población de células mixtas, activación pancreática o inflamación pancreática.
- 20 4. Método de diagnóstico del estado activado o inflamatorio del páncreas en un mamífero, que comprende poner en contacto una muestra biológica obtenida del páncreas de dicho mamífero con IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, y medir el superdesplazamiento del polipéptido STAT3, en el que la presencia del superdesplazamiento es indicativo de la presencia de dicho trastorno.
- 25 5. Método de detección del polipéptido IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra sospechosa de contener un polipéptido IL-22, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con un polipéptido IL-10R β (figura 12; SEC ID No. 3) o un polipéptido IL-22R (figura 11; SEC ID No. 4) y determinar la formación de un conjugado de polipéptidos IL-22/IL-10R β o un conjugado de polipéptidos IL-22/IL-22R en dicha muestra, en el que la formación de un conjugado es indicativa de la presencia de un polipéptido IL-22 en dicha muestra.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha muestra comprende células sospechosas de expresar dicho polipéptido IL-22.
- 35 7. Método según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que dicho polipéptido IL-10R β o dicho polipéptido IL-22R están marcados con un marcador detectable o están unidos a un soporte sólido.
- 40 8. Método de detección de un polipéptido IL-22R tal como se define en la reivindicación 5, o un polipéptido IL-10R β en una muestra sospechosa de contener un polipéptido IL-22R o un polipéptido IL-10R β , comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con un polipéptido IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, y determinar la formación de un conjugado de polipéptidos IL-22R/IL-22 o un conjugado de polipéptidos IL-10R β /IL-22 en dicha muestra, en el que la formación de un conjugado es indicativa de la presencia de un polipéptido IL-22R o un polipéptido IL-10R β en dicha muestra.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha muestra comprende células sospechosas de expresar un polipéptido IL-22R o un polipéptido IL-10R β .
- 50 10. Método según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que dicho polipéptido IL-22 está marcado con un marcador detectable o está unido a un soporte sólido.
- 55 11. Método de unión de una molécula bioactiva a una célula que expresa un polipéptido IL-22, tal como se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula *in vitro* con un polipéptido IL-22R tal como se define en la reivindicación 5, o un polipéptido IL-10R β , que están unidos a dicha molécula bioactiva y permitir la unión de dicho polipéptido IL-22 o dicho polipéptido IL-22 y dicho polipéptido IL-22R y dicho polipéptido IL-10R β , uniéndose de este modo dichas moléculas bioactivas a dicha célula.
- 60 12. Método de unión de una molécula bioactiva a una célula que expresa un polipéptido IL-22R, tal como se define en la reivindicación 5, o un polipéptido IL-10R β , comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula *in vitro* con un polipéptido IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, que está unido a dicha molécula bioactiva y permitir la unión de dicho polipéptido IL-22 y dicho polipéptido IL-22R o dicho polipéptido IL-22 y dicho polipéptido IL-10R β , uniéndose de este modo dichas moléculas bioactivas a dicha célula.
- 65 13. Método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que dicha molécula bioactiva es una toxina, un radiomarcador o un anticuerpo.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha molécula bioactiva provoca la muerte de dicha célula.
15. Método de modulación de por lo menos una actividad biológica de una célula que expresa un polipéptido IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula *in vitro* con (a) un polipéptido IL-22R tal como se define en la reivindicación 5, (b) un polipéptido IL-10R β , o (c) un anticuerpo anti-

ES 2 316 454 T3

polipéptido IL-22, donde dichos (a) polipéptido IL-22R, (b) polipéptido IL-10R β , o (c) anticuerpo anti-polipéptido IL-22, se unen a dicho polipéptido IL-22, modulando de este modo por lo menos una actividad biológica de dicha célula.

5 16. Método de modulación de por lo menos una actividad biológica de una célula que expresa un polipéptido IL-22R tal como se define en la reivindicación 5, o un polipéptido IL-10R β , comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula *in vitro* con (a) un polipéptido IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, (b) un anticuerpo anti-polipéptido IL-22R, o (c) un anticuerpo anti-polipéptido IL-10R β , donde dichos (a) polipéptido IL-22, (b) anticuerpo anti-polipéptido IL-22R, o (c) anticuerpo anti-polipéptido IL-10R β , se unen a dicho polipéptido IL-22R o polipéptido IL-10R β , modulando de este modo por lo menos una actividad biológica de dicha célula.

10 17. Método según las reivindicaciones 15 y 16, en el que se asesina dicha célula.

15 18. Método de identificación de una molécula para el tratamiento de un trastorno pancreático, comprendiendo el método:

cribar las moléculas candidatas por la propiedad de ser un antagonista de IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, mediante el contacto del polipéptido IL-22 con una molécula candidata y la medición de una inhibición detectable de uno o más de:

20 (a) polipéptido IL-22 que se une al polipéptido IL-22R y/o el polipéptido IL-10R β en una mezcla de reacción,

(b) expresión inducida por IL-22 de PAPI por células pancreáticas cultivadas, y/o

25 (c) polipéptido STAT3 inducido por IL-22 en células pancreáticas cultivadas, e

identificar una molécula que tiene la propiedad de ser un antagonista de IL-22 como molécula para el tratamiento de un trastorno pancreático.

30 19. Método según la reivindicación 18, en el que el trastorno pancreático es tal como se define en la reivindicación 3.

20. Anticuerpo antagonista de IL-22 tal como se define en la reivindicación 1, para su uso en un método de tratamiento terapéutico o profiláctico de un trastorno pancreático en un mamífero.

35 21. Anticuerpo de IL-22 según la reivindicación 20, en el que el trastorno pancreático es pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, carcinoma pancreático, incluyendo carcinoma de células acinares o carcinoma pancreático de una población de células mixtas, activación pancreática o inflamación pancreática.

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 454 T3

FIGURA 1

CTTCAGAACAGGTTCTCCTTCCCCAGTCACCAGTTGCTCGAGTTAGAATTGTCTGCAATG
GCCGCCCTGCAGAAATCTGTGAGCTCTTTCCTTATGGGGACCCTGGCCACCAGCTGCCTC
CTTCTCTTGGCCCTCTTGGTACAGGGAGGAGCAGCTGCGCCCATCAGCTCCCAGTGCAGG
CTTGACAAGTCCAACCTCCAGCAGCCCTATATCACCAACCGCACCTTCATGCTGGCTAAG
GAGGCTAGCTTGGCTGATAACAACACAGACGTTTCGTCTCATTGGGGAGAACTGTTCCAC
GGAGTCAGTATGAGTGAGCGCTGCTATCTGATGAAGCAGGTGCTGAACTTCACCCTTGAA
GAAGTGCTGTTCCCTCAATCTGATAGGTTCCAGCCTTATATGCAGGAGGTGGTGCCCTTC
CTGGCCAGGCTCAGCAACAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGATGACCTGCATATC
CAGAGGAATGTGCAAAAAGCTGAAGGACACAGTGAAAAGCTTGGAGAGAGTGGAGAGATC
AAAGCAATTGGAGAACTGGATTTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCCTGCATTTGACCA
GAGCAAAGCTGAAAATGAATAACTAACCCCTTCCCTGCTAGAAATAACAATTAGATG
CCCCAAAGCGATTTTTTTTAACCAAAGGAAGATGGGAAGCCAACTCCATCATGATGGG
TGGATTCCAAATGAACCCCTGCGTTAGTTACAAAGGAAACCAATGCCACTTTTGTTTATA
AGACCAGAAGGTAGACTTCTAAGCATAGATATTTATTGATAACATTTTCATTGTAAGTGG
TGTTCTATACACAGAAAACAATTTATTTTTTAAATAATTGTCTTTTCCATAAAAAGAT
TACTTTCCATTCCCTTAGGGGAAAAAACCCCTAAATAGCTTCATGTTTCCATAATCAGTA
CTTTATATTTATAAATGTATTTATTATTATTATAAGACTGCATTTTATTTATATCATTTT
ATTAATATGGATTTATTTATAGAAACATCATTCGATATTGCTACTTGAGTGTAAGGCTAA
TATTGATATTTATGACAATAATTATAGAGCTATAACATGTTTATTTGACCTCAATAACA
CTTGGATATCCC

ES 2 316 454 T3

FIGURA 2

**MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNFQOPYITNRTFMLA
KEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVP
FLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI**

Péptido señal

1-33

Sitios de N-glicosilación:

54-58

68-72

97-101

Sitios de N-miristoilación:

14-20

82-88

FIGURA 3

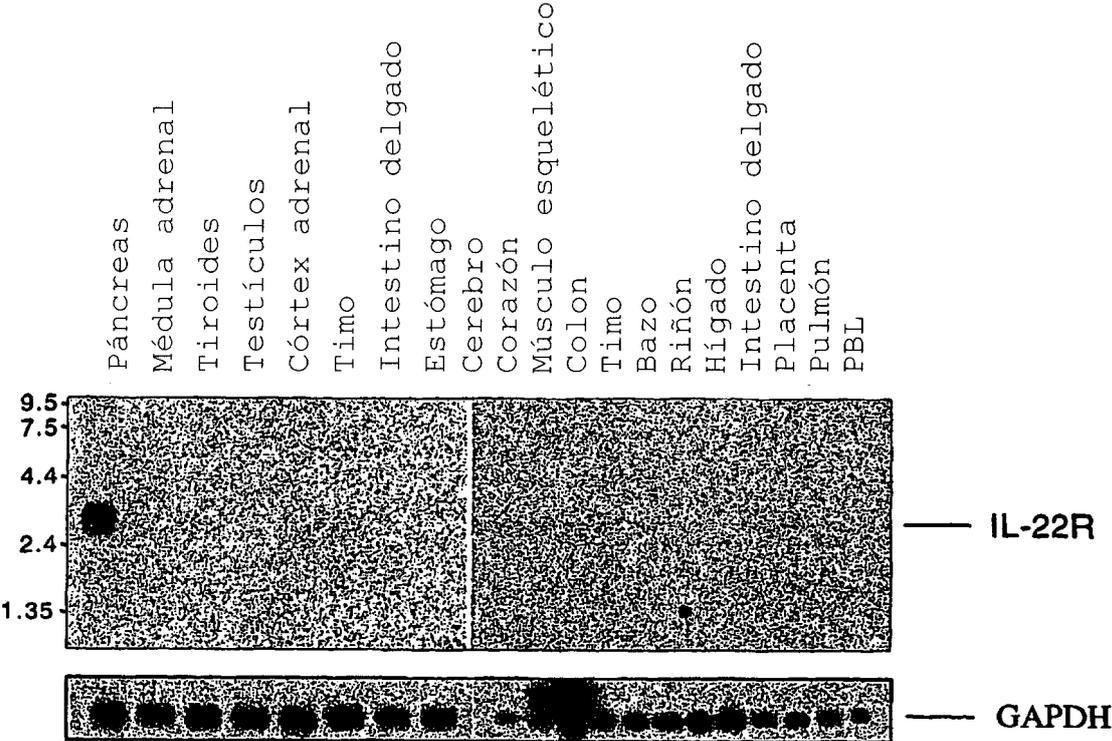


FIGURA 4

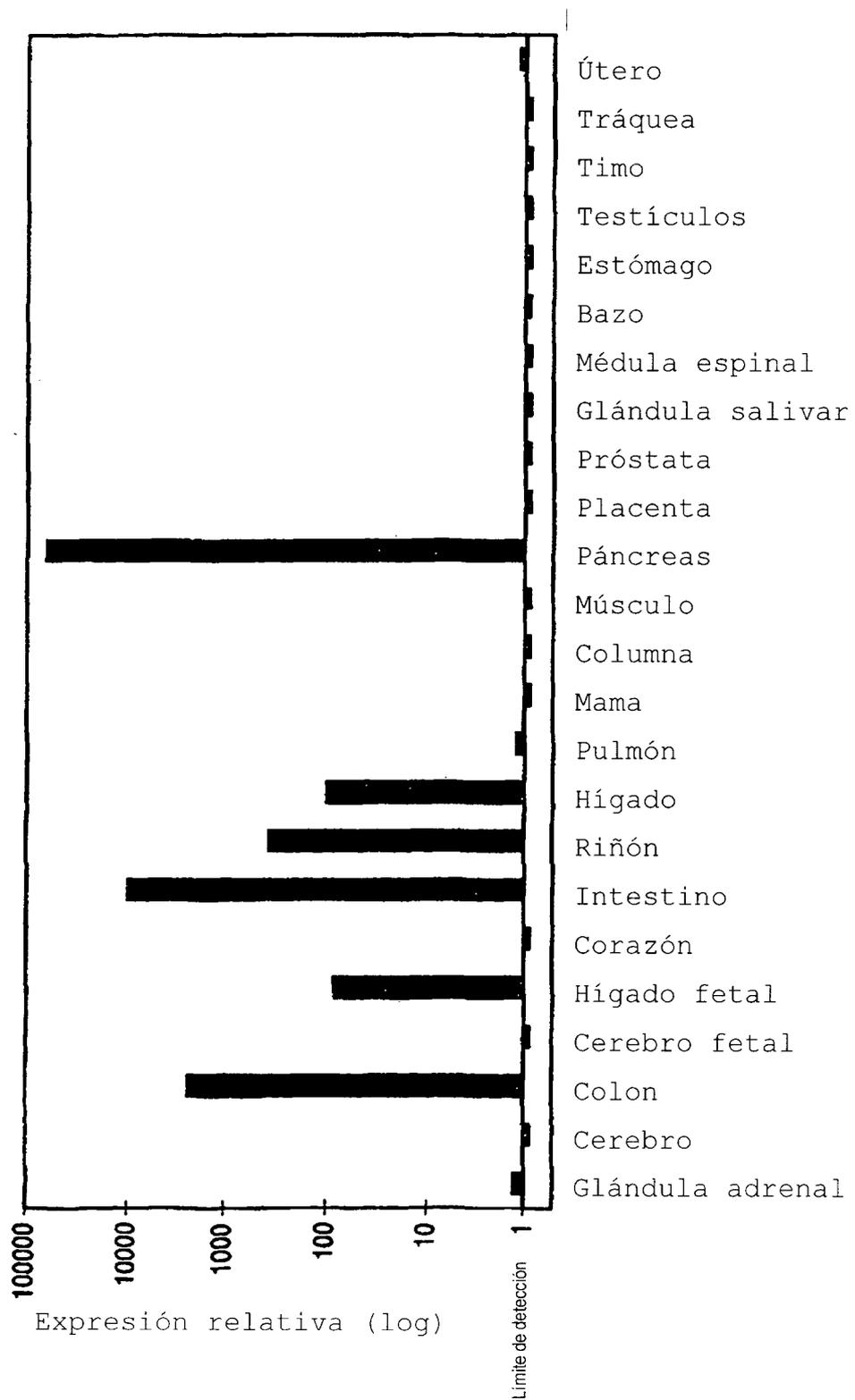


FIGURA 5

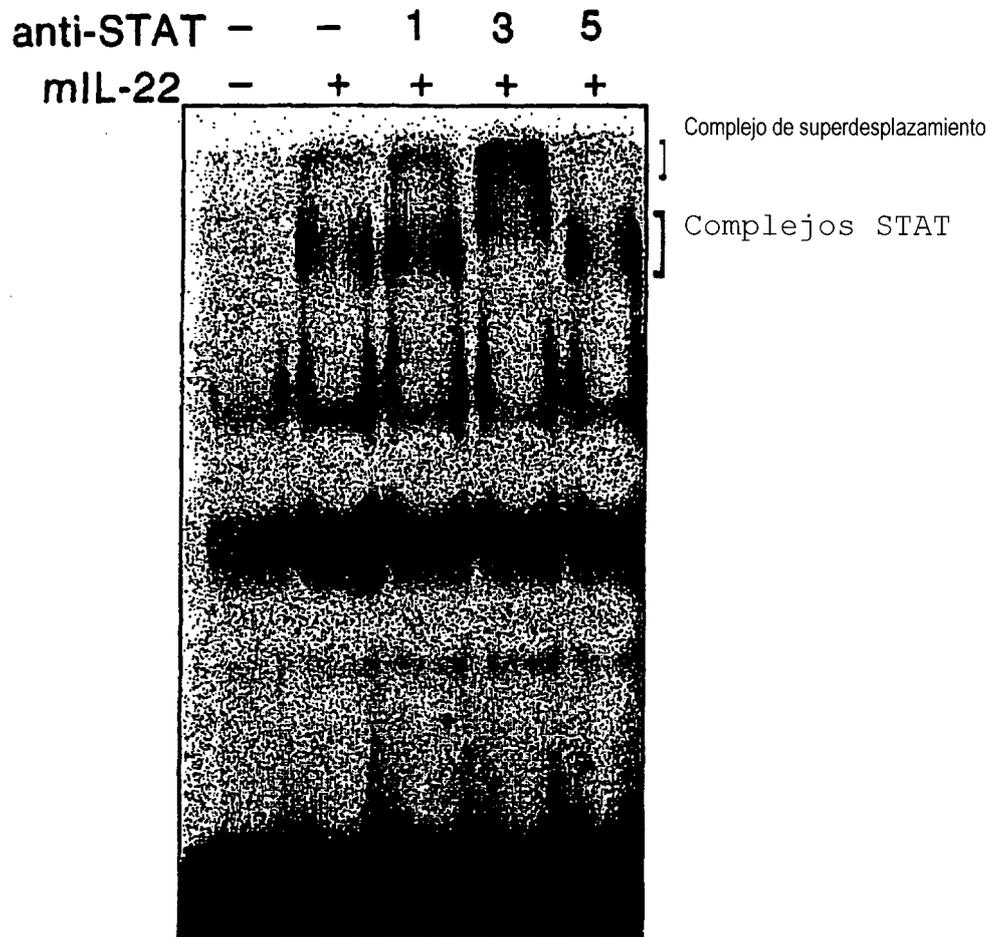


FIGURA 6

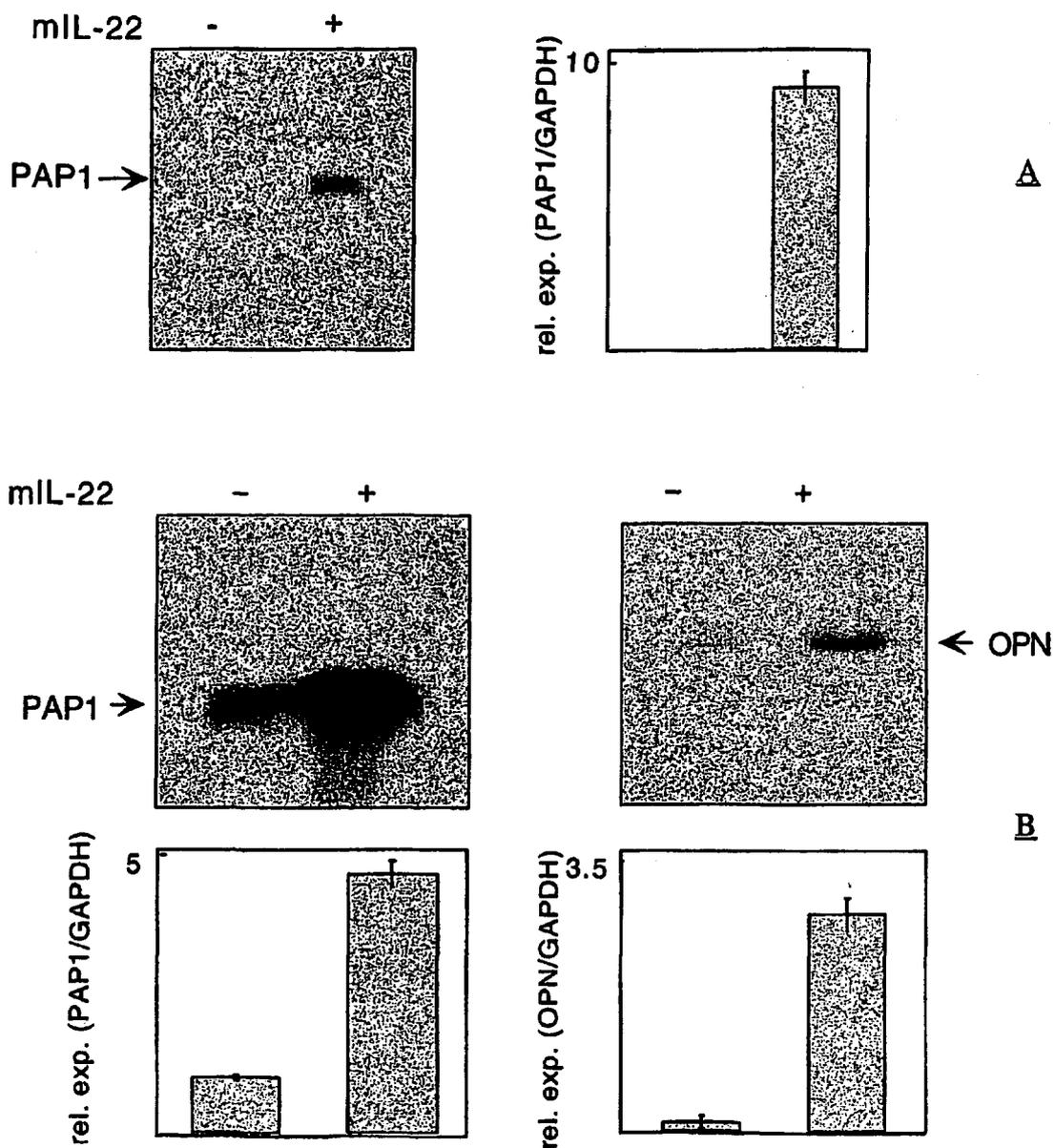


FIGURA 7

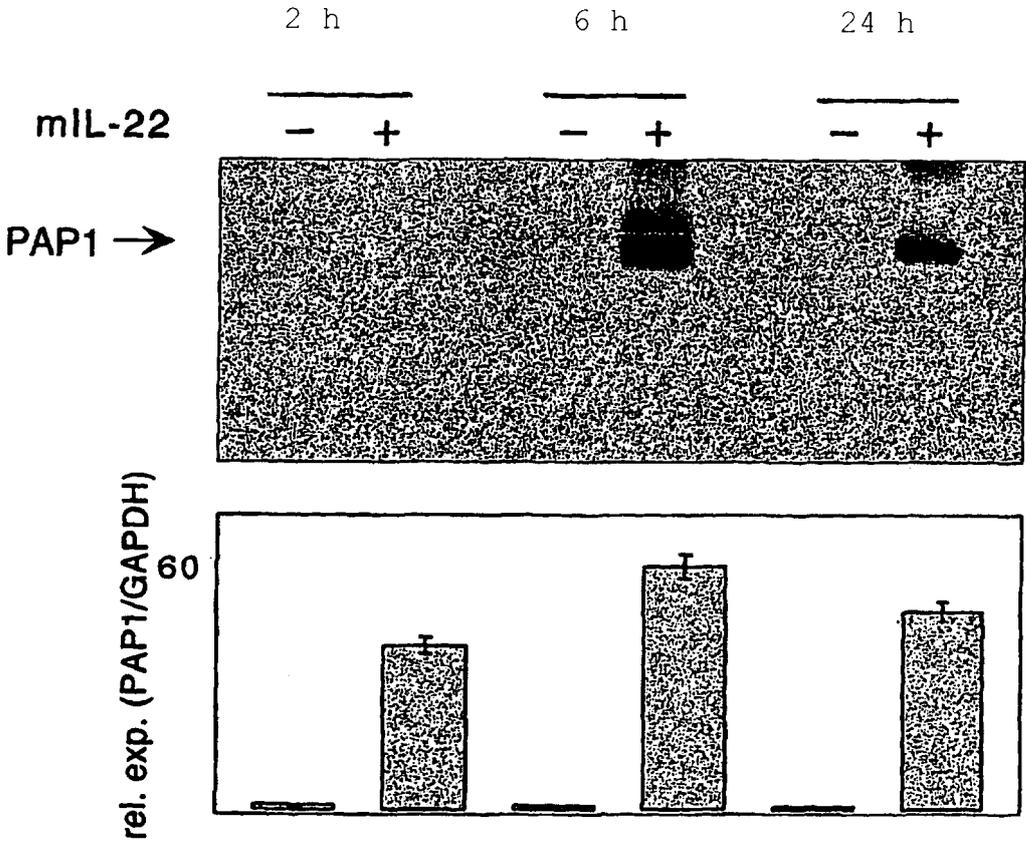
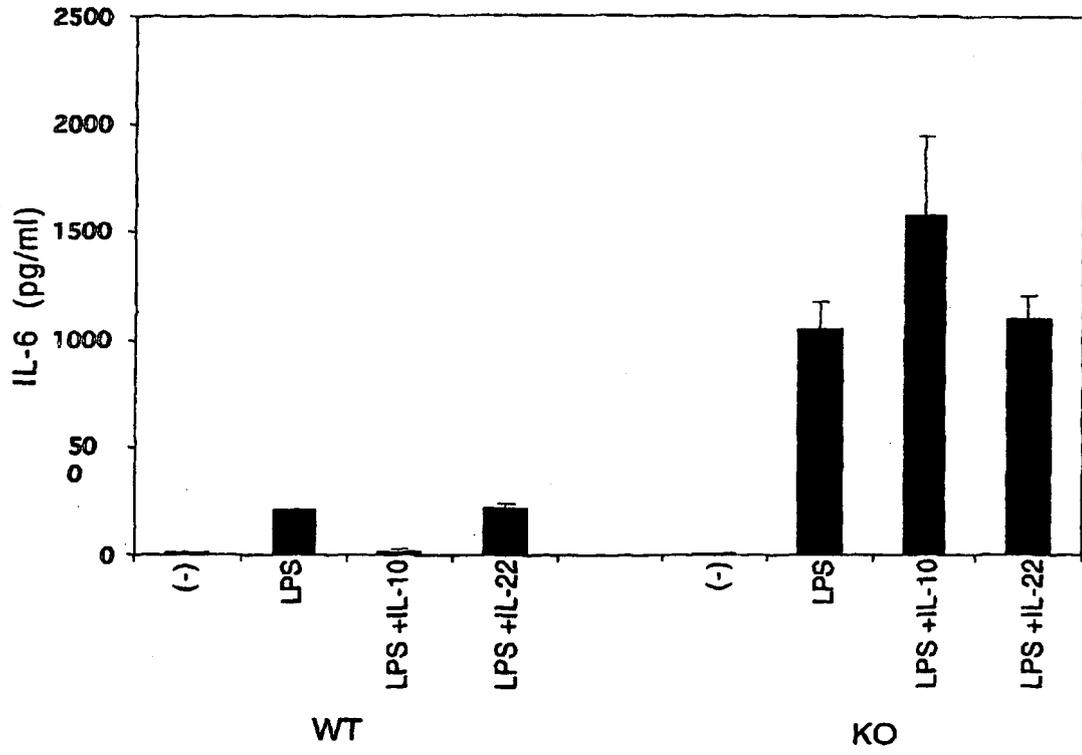


FIGURA 8



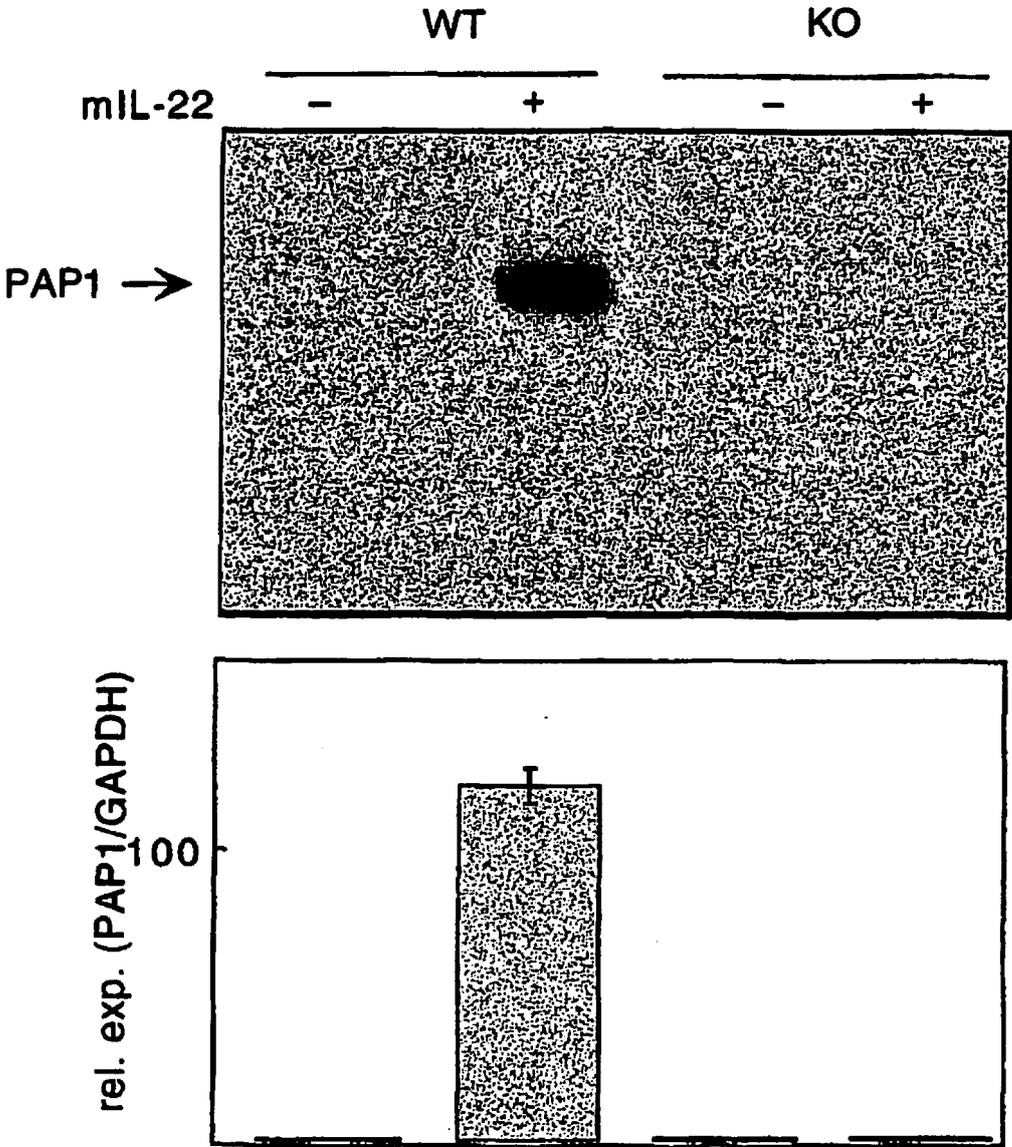


FIGURA 9

IL-10R β

MAWSLGSWLGGCLLVSALGMVPPPENVRMNSVNEFKNILQWESPAFAKGNLTFTAQYLSYR
IFQDKCMNTTLTECDFSSLSKYGDHTLRVRAEFADEHSDWVNITFCPVDDTIIGPPGMQV
EVLADSLHMRFLAPKIENEYETWTMKNVYNSWTYNVQYWKNGTDEKFQITPQYDFEVLRN
LEPWTTYCVQVRGFLPDRNKAGEWSEPVCQTTHDETVPSSWMAVILMASVFMVCLALLG
CFSLLWCVYKTKYAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHNTLLFFSFPLSDENDVFDKLSVIAE
DSESGKQNPGDSCSLGTPPGQGPQS

FIGURA 10

FIGURA 11

IL-22R

MRTLLTILTVGSLAAHAPEDPSDLLQHVKFQSSNFENILTWDSGPEGTPDTVYSIEYKTY
GERDWVAKKGCQRITRKSCNLTVETGNLTELYARVTAVSAGGRSATKMTDRFSSLQHTT
LKPPDVTCISKVRSIQMIVHPTPTPIRAGDGHRLTLEDIFHDLFYHLELQVNRTYQMHLG
GKQREYEFFGLTPDTEFLGTIMICVPTWAKESAPYMCRVKTLPDRTWTYSFSGAFLFSMG
FLVAVLCYLSYRYVTKPPAPPNSLNVQRVLTFOPLRFIQEHVLI PVFDLSGPSSLAQPVO
YSQIRVSGPREPAGAPQRHSLSEITYLGQPDISI LQPSNVPPPQILSPLSYAPNAAPEVG
PPSYAPQVTPEAQFPFYAPQAI SKVQPSYAPQATPDSWPPSYGVCMEGSGKDSPTGTL S
SPKHLRPKGQLQKEPPAGSCMLGGLSLQEV TSLAMEESQEAKSLHQPLGICTDRTSDPNV
LHSGEEGTPQY LKGQLPLLSSVQIEGH PMSLPLQPPSGPCSPSDQGSPWG LLES LVC PK
DEAKSPAPETSDLEQPTELDSLFRGLALTVQWES