

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 023**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 47/38** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/029652**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14145016**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14729996 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 2970422**

54 Título: **Polipéptidos de IL-22 y proteínas de fusión de IL-22 Fc y métodos de uso**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361800148 P**

**15.03.2013 US 201361800795 P**

**15.03.2013 US 201361801144 P**

**08.05.2013 US 201361821062 P**

**30.07.2013 US 201361860176 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**16.07.2018**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**

**Grenzacherstrasse 124**

**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**SCHEER, JUSTIN;**

**OUYANG, WENJUN;**

**STEFANICH, ERIC GARY;**

**VANDLEN, RICHARD;**

**HAAS, PHILIP E.;**

**KOLUMAM, GANESH A.;**

**WANG, XIAOTING;**

**ROSS, JED;**

**VAN BRUGGEN, NICHOLAS y**

**LEE, WYNE, P.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 676 023 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

Polipéptidos de IL-22 y proteínas de fusión de IL-22 Fc y métodos de uso

### 5 Campo

La presente invención se refiere a IL-22 y proteínas de fusión de IL-22 Fc, agonistas de IL-22, composiciones que los comprenden y métodos de preparación y método de uso de los mismos.

### 10 Antecedentes

La interleucina 22 (IL-22) es un miembro de la familia de IL-10 de citocina que es producida por linfocitos Th22, linfocitos NK, células inductoras de tejido linfoide (LTi), células dendríticas y linfocitos Th17. IL-22 se une con el complejo de receptores IL-22R1/IL-10R2, que se expresa en células innatas tales como células epiteliales, hepatocitos y queratinocitos y en tejidos epiteliales de barrera de varios órganos incluyendo dermis, páncreas, intestino y el sistema respiratorio.

IL-22 desempeña un papel importante en la inmunidad de mucosa, mediando en la defensa temprana del hospedador contra la unión y eliminando patógenos bacterianos. Véase Zheng *et al.*, 2008, Nat. Med. 14:282-89. IL-22 promueve la producción de péptidos antimicrobianos y citocinas proinflamatorias de células epiteliales y estimula la proliferación y migración de células epiteliales colónicas en el intestino. Véase Kumar *et al.*, 2013, J. Cancer, 4:57-65. Tras la infección bacteriana, Ratones con IL-22 inactivado presentaron regeneración epitelial intestinal alterada, alta carga bacteriana y mortalidad aumentada. Kumar *et al.*, mencionado anteriormente. De forma similar, la infección de ratones con IL-22 inactivado con virus de la gripe dio como resultado pérdida de peso grave y regeneración alterada de células epiteliales traqueales y bronquiales. Por lo tanto, IL-22 desempeña un papel proinflamatorio en la supresión de la infección microbiana así como un papel protector antiinflamatorio en la regeneración epitelial en respuestas inflamatorias. Mucha de la acción biológica de IL-22 que promueve la inflamación patológica y reparación tisular sigue sin determinarse. Los informes aparentemente contradictorios sobre los efectos de IL-22 en células epiteliales no se entienden aún completamente. Kumar *et al.*, mencionado anteriormente.

La regulación de defensas antimicrobianas, que limita la replicación y diseminación bacteriana, ayudaría a estabilizar la microbiota intestinal reduciendo la producción de LPS posterior y conservando la integridad de la mucosa. IL-22 regula positivamente la expresión de proteínas de fase aguda, incluyendo SAA, y contribuye a la expresión de una serie de genes asociada con respuestas inflamatorias agudas, incluyendo IL-6, G-CSF e IL-1a. La administración sistémica de IL-22 a ratones sanos también regula positivamente proteínas de unión a LPS hasta concentraciones fisiológicamente relevantes para neutralizar LPS en respuesta a infección bacteriana.

Se detecta expresión aumentada de IL-22 en enfermos de trastorno inflamatorio del intestino (EII). Véase, por ejemplo, Wolk *et al.*, 2007, J. Immunology, 178:5973; Andoh *et al.*, 2005, Gastroenterology, 129:969. Se cree que EII tales como enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU) resultan de una respuesta inmunitaria desregulada a la microflora comensal presente en el intestino. Cox *et al.*, 2012, Mucosal Immunol. 5:99-109. Tanto CU como EC son enfermedades complejas que aparecen en individuos genéticamente susceptibles que se exponen a estímulos ambientales aún escasamente definidos. EC y CU están mediadas por mecanismos comunes y distintos y muestran elementos clínicos distintos. Véase Sugimoto *et al.* 2008, J. Clinical Investigation, 118:534-544.

En CU, se produce inflamación principalmente en la mucosa del colon y el recto, lo que conduce a condiciones debilitantes incluyendo diarrea, hemorragia rectal y pérdida de peso. Se cree que la CU está probablemente causada por una respuesta inflamatoria inapropiada por el hospedador a microbios intestinales que penetran a través de una barrera epitelial dañada (Xavier y Podolsky, 2007, Nature 448:427-434). La enfermedad de Crohn está caracterizada por infiltración intestinal de células inmunitarias activadas y distorsión de la arquitectura intestinal. Véase Wolk *et al.*, mencionado anteriormente.

En años recientes, se han ensayado varios fármacos basándose en diversas estrategias para regular la respuesta inmunitaria para tratar EII, incluyendo esteroides, inmunomoduladores y anticuerpos contra citocinas inflamatorias, con éxito variable (Pastorelli *et al.*, Expert opinion on emerging drugs, 2009, 14:505-521). La diversidad compleja de flora intestinal contribuye a la heterogeneidad de la enfermedad. Por lo tanto, existe la necesidad de mejores productos terapéuticos para EII.

La enfermedad cardiovascular (ECV) es una causa importante de mortalidad que resulta, en parte, de enfermedad aterosclerótica de vasos sanguíneos grandes. La aterosclerosis es el principal culpable en acontecimientos de ECV y es una enfermedad lenta y progresiva que resulta de hipercolesterolemia y vasos sanguíneos crónicamente inflamados. Las lesiones ateroscleróticas se caracterizan como cargados de lípidos con infiltración de inmunocitos, especialmente macrófagos y linfocitos T. Se considera ahora que los mecanismos inmunitarios tanto innatos como adaptativos contribuyen a la progresión y con el tiempo trombosis de la placa aterógena (Ross, Am Heart J. Nov 1999;138 (5 Pt 2):S419-20; Hansson 2005 N Engl J Med 352(16): 1685-95; Hansson y Hermansson 2011 Nature

Immunology 12(3): 204-12).

La pancreatitis aguda (PA) es un proceso inflamatorio agudo del páncreas. La lesión renal aguda (LRA) es una pérdida abrupta de la función renal, dando como resultado la retención de urea y otros productos residuales nitrogenados y en la desregulación de volumen extracelular y electrolitos. LRA se conoció previamente como lesión renal aguda. El cambio refleja el reconocimiento reciente de que incluso reducciones más pequeñas en la función renal que no dan como resultado insuficiencia orgánica manifiesta son sustancialmente clínicamente relevantes y están asociadas con morbilidad y mortalidad aumentadas. Sigue existiendo la necesidad de mejor tratamiento para PA y LRA.

El síndrome metabólico es un estado complejo caracterizado por una serie de factores de riesgo que contribuyen a trombosis, hipertensión, dislipidemia e inflamación. La resistencia a la insulina y obesidad son mecanismos patógenos importantes que subyacen al síndrome metabólico.

La resistencia a la insulina aumenta el riesgo de ECV debido a que induce disfunción endotelial que, en combinación con dislipidemia aterógena, inflamación e hipertensión, contribuye a la mortalidad por arteriopatía coronaria (EAC). La resistencia a la insulina persistente también aumenta la probabilidad de desarrollar la diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2) aunque el estado aterógeno se produce muchos años antes de la aparición de DMT2. Es por lo tanto probable que el historial natural de EAC esté en la misma ruta que DMT2 pero comienza mucho más pronto en la vida en una forma subclínica, tardando más en manifestarse clínicamente, con o sin la presencia de diabetes.

La expresión endotoxemia metabólica se acuñó para describir la condición de LPS en plasma aumentado inducido por, por ejemplo, dieta alta en calorías y alta en grasas (DAG) (Cani *et al.* 2007. Diabetes 56(7): 1761-72). Los ratones alimentados con DAG tienen niveles en plasma aumentados de lipopolisacárido (LPS) bacteriano y este aumento parece ser una consecuencia directa de la grasa en la dieta aumentada (Cani *et al.* 2007 mencionada anteriormente; Cani *et al.* 2008 Diabetes 57(6): 1470-81; Ghoshal *et al.* 2009, J Lipid Res 50(1): 90-7). Existen pruebas convincentes de que la microbiota intestinal desempeña una parte integral en el equilibrio de energía del hospedador y recogida de nutrientes dietéticos y metabolismo de carbohidratos, mediante modulación de la función de células epiteliales de la mucosa (Turnbaugh *et al.* 2009, J Physiol (Lond) 587(Pt 17): 4153-8; Manco *et al.* 2010, Endocr Rev 31(6): 817-44). La alteración de la microbiota intestinal que se produce mediante composición de grasa en la dieta desproporcionada o exceso de consumo calórico dietético es un iniciador reconocido de obesidad y resistencia a la insulina, las secuelas establecidas de enfermedad cardiovascular. Se encuentran lipopolisacáridos en la membrana externa de bacterias gramnegativas y actúan como una fuente de endotoxina que puede inducir una fuerte respuesta inmunitaria (Barcia *et al.* Clin Infect Dis 41 Supl 7: S498-503). Las alteraciones en la población, especie y distribución regional de microbiota intestinal pueden conducir a cambios en el catabolismo de LPS y una dieta alta en grasas facilitará la adsorción de LPS a través de la barrera intestinal. En estas condiciones, el LPS aumentado en circulación sistémica inducirá inflamación crónica de grado bajo, activando la respuesta protectora endógena del hospedador a lípidos en plasma elevados que, en la condición crónica, contribuye a la obesidad inducida por dieta, resistencia a la insulina y aterosclerosis, y con el tiempo acontecimientos de ECV.

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica grave que se define por la presencia de niveles de glucosa en sangre elevados de forma crónica (hiperglucemia). Este estado de hiperglucemia es el resultado de una falta relativa o absoluta de actividad de la hormona peptídica, insulina. La insulina es producida y secretada por las células  $\beta$  del páncreas. Se ha indicado que la insulina promueve la utilización de glucosa, la síntesis de proteínas y la formación y el almacenamiento de energía de carbohidratos como glucógeno. La glucosa se almacena en el cuerpo como glucógeno, una forma de glucosa polimerizada, que puede convertirse de nuevo en glucosa para cumplir los requisitos del metabolismo. En condiciones normales, la insulina se secreta a una tasa basal y a tasas aumentadas después de la estimulación por glucosa, todo para mantener la homeostasis metabólica por la conversión de glucosa en glucógeno. Sigue existiendo la necesidad de nuevos paradigmas de tratamiento para aterosclerosis y prevención de acontecimientos de ECV, síndrome metabólico, endotoxemia aguda y septicemia, y trastornos relacionados con la insulina.

La curación de heridas es un proceso complejo, que implica una fase de inflamación, una fase de formación de tejido de granulación y una fase de remodelación de tejido (véase, por ejemplo, Singer y Clark, Cutaneous Wound Healing, N. Engl. J. Med. 341:738-46 (1999)). Estos acontecimientos son desencadenados por citocinas y factores de crecimiento que se liberan en el sitio de lesión. Muchos factores pueden complicar o interferir con la curación de heridas adecuada normal. Por ejemplo, dichos factores incluyen la edad, la infección, la mala nutrición, la inmunosupresión, las medicaciones, la radiación, la diabetes, la enfermedad vascular periférica, la enfermedad sistémica, el tabaquismo y el estrés.

Para sujetos con diabetes, una enfermedad crónica, debilitante, el desarrollo de una úlcera (también denominada herida) de pie diabético es una complicación común. Una úlcera crónica se define como una herida que no sigue un proceso de reparación ordenado y oportuno para producir integridad anatómica y funcional (véase, por ejemplo, Lazarus *et al.*, Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994)). Por su naturaleza, la úlcera de pie diabético es una herida crónica (American Diabetes Association, Consensus development conference on diabetic foot wound care, Diabetes Care, 22(8): 1354-60

(1999)). Debido a que la piel actúa como la barrera primaria frente al ambiente, una herida refractaria abierta puede ser catastrófica; puede producirse una discapacidad (incluyendo pérdida de la extremidad) e incluso la muerte. La ulceración del pie es la precursora de aproximadamente el 85 % de las amputaciones de las extremidades inferiores en personas con diabetes (véase, por ejemplo, Apelqvist, *et al.*, What is the most effective way to reduce incidence of amputation in the diabetic foot? Diabetes Metab Res. Rev., 16(1 Supl.): S75-S83 (2000)). Por lo tanto, Existe la necesidad de acelerar o mejorar la curación de heridas, incluyendo la curación de heridas diabéticas. El documento WO 2011/087986 describe una molécula de IL-22 Fc para regular la actividad/expresión de hepcidina y/o exportación de hierro de una célula.

## 10 Sumario

En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc que se une con el receptor de IL-22, comprendiendo dicha proteína de fusión de IL-22 Fc un polipéptido de IL-22 ligado a una región Fc por un enlazador, en donde la región Fc comprende una región de bisagra, un dominio CH2 IgG y un dominio CH3 IgG, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, preferentemente al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10, y en donde la región Fc no está glucosilada. En determinadas realizaciones, el resto N297 del dominio CH2 se cambia a glicina o alanina. En otras realizaciones determinadas, el resto N297 se cambia a Gly; mientras que en otras realizaciones, el resto N297 se cambia a Ala. En determinadas realizaciones, la unión con el receptor de IL-22 desencadena la señalización corriente abajo del receptor de IL-22, incluyendo la activación de STAT3.

En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En otras realizaciones determinadas, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En otras realizaciones determinadas, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

Las funciones y/o actividades de la proteína de fusión de IL-22 Fc pueden ensayarse mediante métodos *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, ensayo de unión del receptor de IL-22, ensayo de actividad indicadora de luciferasa de Stat3, etc. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona la proteína de fusión de IL-22 Fc producida por el método que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora capaz de expresar la proteína de fusión de IL-22 Fc en condiciones adecuadas para expresión de la proteína de fusión de IL-22 Fc, en donde la célula hospedadora comprende un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de IL-22 Fc. En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa de obtener la proteína de fusión de IL-22 Fc del cultivo celular o medio de cultivo. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino (CHO); mientras que en otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*.

También se describe en el presente documento una proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende un polipéptido de IL-22 ligado a una región Fc IgG por un enlazador, en donde la región Fc comprende una región de bisagra, un dominio CH2 IgG y un dominio CH3 IgG, y en donde la región Fc no está glucosilada. En algunos casos la región de bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de CPPCP (SEQ ID NO: 31). En otras realizaciones determinadas, se cambia el resto N297 en la región Fc y/o se cambia el resto T299 en la región Fc. En determinadas realizaciones, se cambia el resto N297 en el dominio CH2, preferentemente a glicina o alanina. En determinadas realizaciones particulares, el resto N297 se cambia a glicina. En otras realizaciones determinadas, el resto N297 se cambia a alanina. En otros casos más, el resto T299 se cambia a Ala, Gly o Val. En otros casos determinados, el enlazador es de 8-20 aminoácidos de longitud, 8-16 aminoácidos de longitud o 10-16 aminoácidos de longitud.

En otros casos descritos en el presente documento la región Fc comprende el dominio CH2 y CH3 de IgG1. En determinadas realizaciones particulares, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos DKTHT (SEQ ID NO: 32). En determinados casos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos GGDKTHT (SEQ ID NO: 41). En determinados casos, el enlazador es de al menos 11 aminoácidos de longitud y comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 33). En otros casos determinados, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 34), KVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 35), KKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 36), DKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 37), VDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 38) o KVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 39). En determinados casos particulares, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 40). En determinados casos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 67), KVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 68), KKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 66), DKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 64), VDKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 69) o KVDKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 65). En determinados casos particulares, el enlazador no comprende la

secuencia de aminoácidos de GGS (SEQ ID NO: 45), GGGS (SEQ ID NO: 46) o GGGGS (SEQ ID NO: 47). En casos separados, la proteína de fusión de Fc IgG1 IL-22 comprende una secuencia enlazadora de GGGSTHT (SEQ ID NO: 63). En otras realizaciones particulares, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14. En otras realizaciones particulares determinadas, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

En determinados casos descritos en el presente documento, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende el dominio CH2 y CH3 de IgG4. En otros casos determinados, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos SKYGPP (SEQ ID NO: 43). En determinados casos particulares, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos RVESKYGPP (SEQ ID NO: 44). En determinados casos, ninguno de los enlazadores comprende la secuencia de aminoácidos GGS (SEQ ID NO: 45), GGGS (SEQ ID NO: 46) o GGGGS (SEQ ID NO: 47). En otras realizaciones particulares, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10. En realizaciones particulares, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En otro caso descrito en el presente documento la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce por el método que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora capaz de expresar la proteína de fusión de IL-22 Fc en condiciones adecuadas para expresión de la proteína de fusión de IL-22 Fc. En determinados casos, la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce por el método que comprende además la etapa de obtener la proteína de fusión de IL-22 Fc del cultivo celular o medio de cultivo. En determinados casos, la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En otras realizaciones determinadas, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*.

También se describe en el presente documento una composición que comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc, comprendiendo dicha proteína de fusión de IL-22 Fc un polipéptido de IL-22 ligado a una región Fc por un enlazador, en donde la región Fc comprende una región de bisagra, un dominio CH2 IgG y un dominio CH3 IgG, y en donde la composición tiene un nivel de afucosilación en el dominio CH2 de no más del 5 %. En determinados casos, el nivel de afucosilación no es más del 2 %, más preferentemente menos del 1 %. En determinados casos, el nivel de afucosilación se mide por espectrometría de masas. En determinados casos, la región Fc comprende el dominio CH2 y CH3 de IgG4. En determinados casos, la región Fc comprende un dominio CH2 y CH3 de IgG1. En otros casos determinados, la región de bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de CPPCP (SEQ ID NO: 31). En determinados casos, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26. En determinados casos, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24. En determinados casos, la composición se produce por el proceso que comprende las etapas de cultivar una célula hospedadora capaz de expresar la proteína de fusión de IL-22 Fc en condiciones adecuadas para expresión de la proteína de fusión de IL-22 Fc, y obtener la proteína de fusión de IL-22 Fc del cultivo celular o medio de cultivo, en donde la composición tiene un nivel de afucosilación en el dominio CH2 de la región Fc de no más del 5 %. En determinados casos, el nivel de afucosilación no es más del 2 %, más preferentemente menos del 1 %. En determinados casos, la proteína de fusión de IL-22 Fc se obtiene por purificación, preferentemente purificando especies fucosiladas de especies afucosiladas. En determinados casos, la proteína de fusión de IL-22 Fc se purifica por cromatografía de afinidad. En determinados casos, la célula hospedadora es una célula CHO.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc o una composición que comprende proteínas de fusión de IL-22 Fc, dicha proteína de fusión de IL-22 Fc se produce por el proceso que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora capaz de expresar la proteína de fusión de IL-22 Fc en condiciones adecuadas para expresión de la proteína de fusión de IL-22 Fc. En determinadas realizaciones, el proceso comprende además la etapa de obtener la proteína de fusión de IL-22 Fc del cultivo celular o medio de cultivo. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es una célula CHO; mientras que en otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc descrita en el presente documento. En otro aspecto más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc descrita en el presente documento y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición o composición farmacéutica comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26. En determinadas realizaciones particulares, la composición o composición farmacéutica comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones particulares, la proteína de fusión de IL-22 Fc es producida por *E. coli*. En otras realizaciones determinadas, la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc no está glucosilada. En determinadas realizaciones adicionales, la proteína de fusión de IL-22 Fc no induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además una cantidad subóptima de un agente terapéutico tal como dexametasona. En determinadas realizaciones, el polipéptido de IL-22 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Además, según todos y cada uno de los aspectos de la invención, en determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc puede ser una proteína de fusión de IL-22 Fc dimérica (con respecto a IL-22); mientras que en

otras realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc puede ser una proteína de fusión de Fc monomérica (con respecto a IL22).

También se describe en el presente documento una proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica. En determinados casos particulares, la proteína de fusión monomérica comprende una rama de fusión de IL-22 Fc y una rama Fc. En determinados casos, la rama de fusión de IL-22 Fc y la rama Fc comprende un botón o un ojal en la región Fc. En determinados casos, la región Fc de la rama de fusión de IL-22 Fc (la fusión de IL-22 Fc monomérica) comprende un botón y la región Fc de la rama Fc (el Fc monomérico sin unión a IL-22) comprende un ojal. En determinados casos, la región Fc de la rama de fusión de IL-22 Fc (la fusión de IL-22 Fc monomérica) comprende un ojal y la región Fc de la rama Fc (el Fc monomérico sin unión a IL-22) comprende un botón. En otros casos determinados, la proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62. En otros casos determinados, la región Fc de ambas ramas comprende además una mutación N297G. En determinados casos, el IL-22 Fc monomérico se produce por el proceso que comprende la etapa de cultivar una o más células hospedadoras que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico capaces de expresar el primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y el segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62. En otros casos determinados, el método comprende además la etapa de obtener la proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica del cultivo celular o medio de cultivo. En determinados casos, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*. En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición o composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica.

En otro aspecto más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión de IL-22 Fc descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codifica la proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26, preferentemente SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 12, más preferentemente SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones determinadas, el ácido nucleico comprende la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25. En determinadas realizaciones particulares, el ácido nucleico comprende la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11, preferentemente SEQ ID NO: 7. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25, en donde el ácido nucleico aislado es capaz de codificar una proteína de fusión de IL-22 Fc que es capaz de unirse con IL-22R y/o desencadenar actividad de IL-22R y en donde la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc no está glucosilada. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 25, en donde el ácido nucleico aislado es capaz de codificar una proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 10, 12 o 14. En aspectos relacionados, la invención proporciona vectores que comprenden el ácido nucleico descrito anteriormente, y una célula hospedadora que comprende el vector. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es una célula procariota o célula eucariota. En determinadas realizaciones particulares, la célula hospedadora es una célula procariota, incluyendo sin limitación, una célula de *E. coli*. En otras realizaciones determinadas, la célula hospedadora es una célula eucariota, incluyendo sin limitación, una célula CHO. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora comprende un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En un aspecto relacionado adicional, la invención proporciona métodos para preparar la proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende la etapa de cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para expresión de la proteína de fusión de IL-22 Fc. En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa de obtener la proteína de fusión de IL-22 Fc del cultivo celular o medio de cultivo. La proteína de fusión de IL-22 Fc puede obtenerse del cultivo celular o medio de cultivo por cualquier método de aislamiento o purificación de proteínas conocido en la técnica, incluyendo sin limitación, recogida de medio de cultivo, congelación/descongelación, centrifugación, lisis celular, homogeneización, precipitación con sulfato de amonio, HPLC y afinidad, filtración en gel y cromatografía en columna de intercambio iónico. En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa de retirar la proteína de fusión de IL-22 Fc afucosilada. En otras realizaciones determinadas, la proteína de fusión de IL-22 Fc afucosilada se retira por cromatografía de afinidad en columna. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*. En otras realizaciones, la célula hospedadora es una célula CHO.

En otro aspecto más, la invención proporciona una composición o composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

- NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26. En otras realizaciones, la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc no está glucosilada. En determinadas realizaciones, la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc no está glucosilada mientras que el polipéptido de IL-22 está glucosilado. En determinadas de estas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce en células CHO. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc no induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En otras realizaciones más, la composición farmacéutica comprende además dexametasona o un antagonista de TNF. En determinadas realizaciones particulares, la dexametasona o un antagonista de TNF está presente en una cantidad subóptima.
- En otros casos determinados descritos en el presente documento, la composición farmacéutica que comprende proteínas de fusión de IL-22 Fc tiene un nivel de afucosilación en el dominio CH2 de no más del 5 %, preferentemente no más del 2 %, más preferentemente menos del 1 %. En determinados casos particulares, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26, preferentemente SEQ ID NO: 24. En otros casos determinados, la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce en células CHO. En determinados casos particulares, el sujeto es un ser humano. En determinados casos, la composición farmacéutica se administra de forma sistemática o por vía tópica. En otras realizaciones determinadas, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o por vía tópica.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc descritos en el presente documento y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un agente gelificante. En determinadas realizaciones, el agente gelificante es un polisacárido. En algunas realizaciones, el agente gelificante es, sin limitación, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polímeros en bloque POE-POP, alginato, ácido hialurónico, ácido poliacrílico, hidroxietilmetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. En algunas realizaciones, el polisacárido es un agente celulósico tal como, sin limitación, hidroxietilmetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. En determinadas realizaciones, el agente gelificante es hidroxipropilmetilcelulosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es para administración tópica. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica para administración tópica comprende un polipéptido de IL-22. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica para administración tópica comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica para administración tópica comprende un polipéptido de IL-22 sin una fusión con Fc.
- En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en métodos para tratar EII en un sujeto que lo necesite que comprenden administrar al sujeto la composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención. En determinadas realizaciones, la EII es colitis ulcerosa. En otras realizaciones determinadas, la EII es enfermedad de Crohn. En determinadas realizaciones particulares, la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc no está glucosilada. En determinadas realizaciones, se cambia el resto N297 y/o el resto T299 de la región Fc. En determinadas realizaciones, se cambia el resto N297 de la región Fc. En otras realizaciones determinadas, el resto N297 se cambia a Gly o Ala, preferentemente Gly. En otras realizaciones determinadas, se cambia el resto T299, preferentemente a Val, Gly o Ala. En determinadas realizaciones particulares, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14, preferentemente SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce en *E. coli* o una célula CHO. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones determinadas, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o por vía tópica.
- En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en métodos de tratamiento de una cualquiera o una combinación de las siguientes enfermedades usando un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc de la presente invención: diabetes de tipo II, diabetes de tipo II con obesidad mórbida, heridas (incluyendo heridas diabéticas y úlceras diabéticas), quemaduras, úlceras (incluyendo úlcera de presión y úlcera venosa), enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, endotoxemia (aguda y leve), septicemia, cardiopatía coronaria aguda, hipertensión, dislipidemia, obesidad, hiperglucemia, trastornos del metabolismo de lípidos, hepatitis, hepatitis aguda, insuficiencia renal, insuficiencia renal aguda, lesión renal aguda, fallo de injerto renal, función de injerto retardada en trasplante renal postfallecimiento, nefropatía inducida por contraste, pancreatitis, pancreatitis aguda, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar. En determinadas realizaciones, la pancreatitis aguda puede ser enfermedad de leve a moderada a grave. En determinadas realizaciones, la pancreatitis aguda incluye enfermedad post CPRE (colangiopancreatografía retrógrada endoscópica). En algunas realizaciones adicionales, el paciente para tratar para la enfermedad anterior necesita un cambio en su perfil lipídico de HDL/LDL, que puede ser alterado por el polipéptido de IL-22 o proteínas de fusión de IL-22 Fc en el paciente para aumentar HDL y reducir LDL. En un aspecto relacionado, la invención proporciona usos de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una cualquiera o combinaciones de las enfermedades anteriores.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en métodos de inhibición de la infección microbiana en el intestino o conservación de células caliciformes en el intestino

durante una infección microbiana, de un sujeto que lo necesite que comprenden la etapa de administrar al sujeto la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención. En otros aspectos relacionados, la invención proporciona métodos para potenciar la integridad de células epiteliales, curación de la mucosa, proliferación de células epiteliales, diferenciación de células epiteliales, migración de células epiteliales o curación de células epiteliales en el intestino en un sujeto que lo necesite que comprenden administrar al sujeto la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención. En determinadas realizaciones, la célula epitelial es célula epitelial intestinal.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en un método para prevenir o tratar una afección cardiovascular, incluyendo dicha afección una patología de formación de placas ateroscleróticas. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc. La afección cardiovascular incluye, por ejemplo, arteriopatía coronaria, enfermedad microvascular coronaria, ictus, arteriopatía carotídea, arteriopatía periférica y nefropatía crónica. El método puede incluir ralentizar adicionalmente la progresión de formación de placas ateroscleróticas. El método puede incluir además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto para la prevención o el tratamiento de la afección cardiovascular.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en un método para tratar el síndrome metabólico. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc. El método puede incluir además reducir uno o más factores de riesgo asociados con síndrome metabólico, incluyendo uno o más de obesidad abdominal, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión. El método puede incluir además reducir el nivel de lipopolisacárido (LPS) bacteriano en el sujeto. El método puede incluir además administrar uno o más agentes adicionales al sujeto para la prevención o el tratamiento del síndrome metabólico.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en un método para retardar o ralentizar la progresión de la aterosclerosis. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc. El método puede incluir además administrar uno o más agentes adicionales al sujeto para retardar o ralentizar la progresión de la aterosclerosis.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en un método para prevenir indicaciones de aterosclerosis. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc a un sujeto en riesgo de aterosclerosis, en donde el polipéptido de IL-22 de la proteína de fusión de IL-22 Fc es eficaz contra el desarrollo de indicaciones de aterosclerosis. En determinadas realizaciones, se ha identificado que el sujeto está en riesgo de desarrollar una afección cardiovascular. En determinadas realizaciones, el sujeto está genéticamente en riesgo de desarrollar una afección cardiovascular. En una o más realizaciones, las indicaciones de aterosclerosis incluyen acumulación de placas. En algunas realizaciones, las indicaciones de aterosclerosis incluyen inflamación vascular. El método puede incluir además administrar uno o más agentes adicionales al sujeto para prevenir las indicaciones de aterosclerosis.

En otro aspecto más, se proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en un método para tratar uno o más de endotoxemia aguda y septicemia. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc. El método puede incluir además administrar uno o más agentes adicionales al sujeto para tratar uno o más de endotoxemia aguda y septicemia.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en un método para acelerar o mejorar la curación de heridas, o ambas, en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc o un agonista de IL-22. En determinadas realizaciones, la herida es una herida crónica. En otras realizaciones determinadas, la herida es una herida infectada. En determinadas realizaciones, el sujeto es diabético, incluyendo un sujeto con diabetes de tipo II. En una o más realizaciones, la herida es una úlcera de pie diabético. En determinadas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc o un agonista de IL-22 se administra hasta que haya cierre de la herida completo. En algunas realizaciones, la administración es sistémica; y en otras realizaciones, la administración es tópica. En determinadas realizaciones, el polipéptido de IL-22, la proteína de fusión de IL-22 Fc o el agonista de IL-22 está en una formulación para la administración tópica. En determinadas realizaciones, la formulación tópica comprende un polipéptido de IL-22 sin una fusión con Fc. En determinadas realizaciones, el agonista de IL22 se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc, un agonista de IL-22, un polipéptido de IL-19, una proteína de fusión de IL-19 Fc, un agonista de IL-19, un polipéptido de IL-20, una proteína de fusión de IL-20 Fc, un agonista de IL-20, un polipéptido de IL-24, una proteína de fusión de IL-24 Fc, un agonista de IL-24, un polipéptido de IL-26, una proteína de fusión de IL-26 Fc, un agonista de IL-26 y un agonista de IL-22R1. En otras realizaciones determinadas, el agonista de IL-22 se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc, un agonista de IL-22, un polipéptido de IL-20, una proteína de fusión de IL-20 Fc, un agonista de IL-20, un polipéptido de IL-24, una proteína de fusión de IL-24 Fc, un agonista de IL-24 y un agonista de IL-22R1. En

determinadas realizaciones, el agonista de IL-22R1 es un anticuerpo agonista anti IL22R1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica como se describe para su uso en métodos de tratamiento de un síndrome metabólico que comprenden la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agonistas de IL-22. En determinadas realizaciones, el agonista de IL22 se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc, un agonista de IL-22, un polipéptido de IL-19, una proteína de fusión de IL-19 Fc, un agonista de IL-19, un polipéptido de IL-20, una proteína de fusión de IL-20 Fc, un agonista de IL-20, un polipéptido de IL-24, una proteína de fusión de IL-24 Fc, un agonista de IL-24, un polipéptido de IL-26, una proteína de fusión de IL-26 Fc, un agonista de IL-26 y un agonista de IL-22R1. En otras realizaciones determinadas, el agonista de IL-22 se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc, un agonista de IL-22, un polipéptido de IL-20, una proteína de fusión de IL-20 Fc, un agonista de IL-20, un polipéptido de IL-24, una proteína de fusión de IL-24 Fc, un agonista de IL-24 y un agonista de IL-22R1. En determinadas realizaciones, el agonista de IL-22R1 es un anticuerpo agonista anti IL22R1. En otras realizaciones determinadas, el síndrome metabólico es diabetes. En determinadas realizaciones particulares, el síndrome metabólico es diabetes de tipo II.

Según otra realización, el método incluye administrar al sujeto una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el polipéptido de IL-22 o la proteína de fusión de Fc IL22 se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía sistémica o por vía tópica.

En determinadas realizaciones de estos aspectos, la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc no está glucosilada. En determinadas realizaciones, se cambia el resto N297 y/o el resto T299 de la región Fc. En determinadas realizaciones, se cambia el resto N297 de la región Fc. En otras realizaciones determinadas, el resto N297 se cambia a Gly o Ala, preferentemente Gly. En otras realizaciones determinadas, se cambia el resto T299, preferentemente a Val, Gly o Ala. En determinadas realizaciones particulares, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 14, preferentemente SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce en *E. coli*. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones determinadas, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía tópica.

En otros casos determinados, la composición farmacéutica que comprende proteínas de fusión de IL-22 Fc tiene un nivel de afucosilación en el dominio CH2 de no más del 5 %, preferentemente no más del 2 %, más preferentemente menos del 1 %. En determinados casos particulares, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 26, preferentemente SEQ ID NO: 24. En otros casos determinados, la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce en células CHO. En determinados casos particulares, el sujeto es un ser humano. En otros casos determinados, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía tópica.

En otros casos más de los aspectos anteriores, el N-glucano unido a la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc se retira enzimáticamente por una enzima glucolítica. En determinadas realizaciones, la enzima glucolítica es péptido-N-glucosidasa (PNGasa). En determinadas realizaciones particulares, el sujeto es un ser humano.

También se describen en el presente documento usos de una proteína de fusión de IL-22 Fc descrita en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento de EII, incluyendo CU y EC, en un sujeto que lo necesite. También se describe en el presente documento el uso de una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención en la preparación de un medicamento para inhibir la infección microbiana en el intestino o conservar células caliciformes en el intestino durante una infección microbiana en un sujeto que lo necesite. Se describe además en el presente documento el uso de una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención en la preparación de un medicamento para potenciar la integridad de células epiteliales, proliferación de células epiteliales, diferenciación de células epiteliales, migración de células epiteliales o curación de heridas epiteliales en el intestino, en un sujeto que lo necesite. También se describen en el presente documento usos de un polipéptido de IL-22 o proteína de fusión de IL-22 Fc en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección cardiovascular, síndrome metabólico, aterosclerosis, lesión renal aguda, pancreatitis aguda, aceleración, promoción o mejora de la curación de heridas, incluyendo sin limitación, curación de una herida crónica, herida diabética, herida infectada, úlcera de presión o úlcera de pie diabético, en un sujeto que lo necesite.

Todas y cada una de las realizaciones pueden combinarse a menos que el contexto claramente sugiera otra cosa. Todas y cada una de las realizaciones pueden aplicarse a todos y cada uno de los aspectos de la invención a menos que el contexto claramente sugiera otra cosa.

Realizaciones específicas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

## Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de IL-22 madura de diferentes especies de mamíferos: ser humano (n.º de referencia de GenBank Q9GZX6, SEQ ID NO: 4, chimpancé (n.º de referencia de GenBank XP\_003313906, SEQ ID NO: 48), orangután (n.º de referencia de GenBank XP\_002823544, SEQ ID NO: 49), ratón (n.º de referencia de GenBank Q9JJY9, SEQ ID NO: 50) y perro (n.º de referencia de GenBank XP\_538274, SEQ ID NO: 51).

La **Figura 2** muestra resultados de espectrometría de masas del estado de glucosilación de la región Fc de un Fc IgG1 monoclonal humano típico (Panel A), fusión de Fc IgG1 IL-22 que contiene la secuencia enlazadora EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 33, Panel B), EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 40, Panel C) y GGGDKTHT (SEQ ID NO: 41, Panel D), y fusión de Fc IgG4 IL-22 que contiene la secuencia enlazadora RVESKYGPP sin o con la mutación N297G (SEQ ID NO: 44, Paneles E y F, respectivamente) y fusión de Fc IgG1 IL-22 que contienen la secuencia enlazadora EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 40) con la mutación N297G (Panel G).

La **Figura 3** muestra el alineamiento de secuencias de fusión de Fc IgG4 IL-22 humana (N297G, secuencia de Fc de longitud completa con la Lys C terminal, SEQ ID NO: 16, sin Lys SEQ ID NO: 8), fusión de Fc IgG1 IL-22 (N297G, secuencia de Fc de longitud completa con la Lys C terminal, SEQ ID NO: 20, sin Lys SEQ ID NO: 12) e IL-22 (SEQ ID NO: 4). La secuencia de IL-22 mostrada es la forma madurada sin la secuencia líder. La secuencia de bisagra CPPCP (SEQ ID NO: 31) se muestra en la caja, seguida de los dominios CH2 y CH3. La sustitución N297G y el resto de Lys C terminal opcional están marcados.

La **Figura 4** presenta una gráfica que muestra los resultados del ensayo de luciferasa de STAT3. La actividad luciferasa estimulada por la fusión de Fc IgG4 IL-22 o fusión de Fc IgG1 IL-22 se midió en células 293 que expresan IL-22R humano. Los resultados muestran que la fusión de Fc IgG4 IL-22 e IgG1 IL-22 mostraron actividad *in vitro* similar.

La **Figura 5** muestra los efectos terapéuticos de la proteína de fusión de IL-22 Fc de ratón en el modelo de EII de ratón inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS). La proteína de fusión de IL-22 Fc de ratón mejoró la histología del colon en los ratones de EII inducida por DSS (**Figura 5B**) y la mejora se tradujo a puntuación de histología de colon reducida (**Figura 5C**). El tratamiento con proteína de fusión de IL-22 Fc dio como resultado reducción de la pérdida de peso de los ratones durante el tratamiento en comparación con dexametasona, actualmente el mejor tratamiento de referencia en este modelo (**Figura 5A**).

La **Figura 6** muestra la tasa de eliminación del suero de proteínas de fusión de Fc IgG4 e IgG1 IL-22 humanas en monos cynomolgus a los que se administraron 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg el día 0 y el día 7.

La **Figura 7** muestra los niveles en suero de tres genes corriente abajo de IL-22R en monos cynomolgus después de administrarles 0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg el día 1 y el día 8 (mismo régimen de dosificación que el día 0 y el día 7 en la Figura 6). La **Figura 7A** muestra aumentos dependientes de dosis en amiloide de suero A (ASA), la **Figura 7B** muestra aumentos dependientes de dosis en proteína de unión a lipopolisacárido (LPS-BP), la **Figura 7C** muestra aumentos dependientes de dosis en RegIII/proteína asociada a pancreatitis (PAP o PancrePAP), después de administración de Fc hIL-22.

La **Figura 8** muestra una MicroCT de alta resolución que demuestra la carga de placas ateroscleróticas en el arco aórtico y la arteria braquiocefálica de un ratón Ldlr-/Apobec1-/ de 8 meses de edad con dieta alta en grasas.

La **Figura 9** muestra que los ratones Ldlr-/Apobec1-/ eran sensibles a exposiciones en la dieta y mostraron un nivel sustancialmente elevado de aterosclerosis como se midió a partir de microCT (**A**), pero con niveles solamente modestamente aumentados de LDL en suero (**B**).

La **Figura 10** muestra la respuesta de ratones Ldlr-/Apobec1-/ a un estímulo de inflamación de grado bajo agudo, que demuestra un aumento en MCP-1 (**A**) e IL-6 (**B**) en suero mayor que las observaciones en ratones C57 wt y acompañado de pérdida de función vascular como se evalúa mediante dilatación mediada por flujo e infusión de nitroglicerina (**C**).

La **Figura 11** muestra que la exposición a endotoxina crónica da como resultado dislipidemia (**A**) y mayor carga de placas (**B**) e inestabilidad (**C**).

La **Figura 12** muestra que la glucosa en sangre en ayunas se redujo en el grupo tratado con IL-22-Fc en comparación con controles (**A**) y se mejoró la eliminación de glucosa con tratamiento con IL-22-Fc como se ve a partir del ensayo de tolerancia a la glucosa (**B**, **C**).

La **Figura 13** muestra que se produce reducción de colesterol total después del tratamiento con IL-22-Fc. En ratones Ldlr-/Apobec1-/ el colesterol total estaba elevado, en condiciones tanto en ayunas como alimentados, y se redujo en el grupo de IL-22-Fc en comparación con los controles como se mide al final del periodo de tratamiento (**A**). Los niveles de triglicéridos en plasma también se redujeron tras el tratamiento con IL-22-Fc con una reducción notable en el estado alimentado (**B**).

La **Figura 14** muestra que la hiperlipidemia vista en el ratón Ldlr-/Apobec1-/ se redujo después del tratamiento con IL-22-Fc. LDL se redujo en el estado tanto de ayunas como alimentado (**A**), HDL se elevó (**B**), y la relación LDL/HDL se redujo tanto en ayunas como alimentados (**C**). vLDL se redujo en condiciones de alimentación (**D**). Los resultados de HDL (**E**), LDL (**F**) y relación LDL/HDL (**G**) se representaron después de 5 días con ratones a los que se proporcionaron dos dosis.

La **Figura 15** muestra que los niveles de LPS en plasma se redujeron después del tratamiento con IL-22-Fc.

La **Figura 16** muestra medida de la función endotelial mejorada por reactividad vascular después del tratamiento con IL-22-Fc.

La **Figura 17** representa el análisis cuantitativo de carga de placas realizado usando microCT potenciado por contraste en muestras *post mortem* del arco aórtico diseccionado, aorta ascendente y descendente (**A**), la arteria braquiocefálica (**B**) y válvula aórtica (**C**).

La **Figura 18** muestra pesos corporales (**A**) y consumo de alimentos (**B**) después del tratamiento con IL-22-Fc.

La **Figura 19** representa un esquema de régimen de tratamiento de modelo de ratón diabético.

Las **Figuras 20A-C** muestran el peso corporal y los niveles de glucosa en suero en ratones *db/db* que demuestran que IL-22-Fc redujo significativamente la glucosa en los ratones obesos.

La **Figura 21** muestra que el tratamiento con IL-22Fc mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina basándose en el ensayo de tolerancia a la glucosa (ETG).  $p < 0,05$

Las **Figuras 22A-B** muestran que el tratamiento con IL-22Fc mejoró la sensibilidad a la insulina basándose en el ensayo de tolerancia a la insulina (ETI) como se midió mediante los niveles de glucosa mg/dl (**A**) y el % de reducción de glucosa (**B**).

La **Figura 23** muestra que IL-22Fc aumentó la expresión de insulina en islotes. (**A**) El verde muestra glucagón, el rojo muestra insulina. El área dentro de un círculo rodeada por una línea roja muestra el área de islote. Barra, 50  $\mu$ m. (**B**) Intensidad de tinción de insulina promedio. (**C**) Intensidad de tinción de glucagón promedio. (**D**) Niveles de insulina con alimentación en ratones alimentados con DAG. (**E**) Niveles de insulina en ayunas en ratones alimentados con DAG. (**F**) Insensibilidad a insulina invertida por IL-22 Fc en ratones alimentados con DAG. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Barras de error, e.t.m.

Las **Figuras 24A-B** representan análisis cuantitativo de la intensidad de señal de insulina en animales tratados con IL-22-Fc.

Las **Figuras 25A-B** muestran que el área positiva para insulina aumentó en animales tratados con IL-22-Fc en comparación con el control.

La **Figura 26** muestra secciones histológicas que demuestran una reducción en la esteatosis periportal hepática con tratamiento con IL-22-Fc (**B**) en comparación con el control (**A**).

Las **Figuras 27A-B** muestran una evaluación de IL-22R en tolerancia a la glucosa inducida por DAG. (**A**) Niveles de glucosa (mg/dl) a lo largo del tiempo después de inyección ip de glucosa. (**B**) Cálculo del área total bajo la curva (ABC).

La **Figura 28** muestra la masa de ratones KO para el receptor de IL-22 en comparación con el control compañero de camada.

**Figuras 29A-D** Se trataron ratones *Ldlr*  $-/-$ , *Apobec1*  $-/-$  (dko) con 50  $\mu$ g de IL-22Fc o 50  $\mu$ g de antiambrosía (n=6 por grupo) durante 48 horas. Se redujo el LPS en suero en 50 % ( $p=0,0052$ ) y se redujo LDL/HDL en suero en 30 % ( $p=0,049$ ) en ratones tratados con IL-22Fc.

La **Figura 30** muestra una secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica una IL-22 humana nativa (SEQ ID NO: 70).

La **Figura 31** muestra la secuencia de aminoácidos obtenida de la secuencia codificante mostrada en la FIG. 30 (SEQ ID NO: 71).

La **Figura 32A** muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de IL-22 de ratón-IgG2a de ratón (SEQ ID NO: 73). La **Figura 32B** muestra la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de IL-22 de ratón-IgG2a de ratón (SEQ ID NO: 72).

La **Figura 33** muestra que la falta de señalización mediante IL-22R da como resultado curación de heridas retardada. Las heridas de ratones IL-22R KO se retardaron significativamente ( $p=0,0018$  el día 10 y  $p=0,005$  el día 12) en la curación en comparación con ratones de control compañeros de camada WT.

Las **Figuras 34A-C** representan aperturas de herida de ratones individuales (n=10) los días 10, 12 y 15. Se muestran imágenes de fotografías representativas de las heridas tanto para ratones IL-22R KO como para WT el día 14 (**D**).

La **Figura 35** ilustra la comparación de curación de heridas entre ratones WT de control (BKS) y ratones diabéticos *db/db*. (**A**) La curación de heridas en los ratones *db/db* estuvo considerablemente retardada durante todo el periodo de estudio y no se curaron completamente incluso el día 28. La gráfica de barras en (**B**) muestra el nivel de expresión de IL-22 como factor de cambio en ratones de tipo silvestre o *db/db* días después de la escisión de heridas.

La **Figura 36** es una representación esquemática del diseño de estudio para ensayar IL-22-Fc en ratones *db/db* en un total de 3 grupos (n=7). Se usó antiambrosía para proteína de Fc de control y anticuerpo anti FGFR1 como control positivo para regulación de la glucosa.

La **Figura 37** muestra el nivel de glucosa con alimentación normalizado por IL-22 Fc de ratones tratados en comparación con controles desde el día 4 hasta el día 27. Los niveles de glucosa se registraron usando un glucómetro Onetouch®.

La **Figura 38** muestra gráficamente la medición de hueco de herida comparativa de IL-22-Fc en comparación con 2 anticuerpos de control: antiambrosía y anti FGFR1. Cada punto de datos representa un promedio de 7 ratones/grupo.

Las **Figuras 39A-D** muestran mediciones de huecos de heridas individuales los días 15, 19, 21, y el día 27. Se muestran las fotografías de ratones representativos el día 27 (**E**).

La **Figura 40** es una representación esquemática del diseño de estudio para ensayar la dosificación tópica frente a sistémica de IL-22-Fc en comparación con tratamiento de anticuerpo de control en ratones *db/db*; Total 3 grupos (n=7).

La **Figura 41A-B** muestra gráficamente la medición de huecos de heridas comparativa de dosificación tópica frente a sistémica de IL-22-Fc con tratamiento tópico de Fc de control. Se usó anticuerpo antiambrosía como un anticuerpo de control Fc. Cada punto de datos representa un promedio de 7 ratones/grupo.

La **Figura 42** muestra fotográficamente tejido de herida retirado quirúrgicamente de ratones representativos que muestran una vista superior así como posterior el día 22 de IL-22-Fc (**B**) y anticuerpo de control (**A**).

La **Figura 43A** muestra la estrategia para la generación de ratones IL-22R KO. La **Figura 43B** muestra resultados de RT-PCR de expresión de ARNm de IL-22Ra1 en colon de ratones IL-22R KO y WT. La **Figura 43C** muestra resultados de RT-PCR de expresión de ARNm de Reg3b en colon de ratones IL-22R KO y WT 2 días después de una inyección de una única dosis de IL-22 Fc o IgG de control. \*\*\*P<0,001. Barras de error, e.t.m.

La **Figura 44** muestra resultados que demuestran que ratones obesos montaron respuestas a IL-22 defectuosas. **(A-D)** Linfocitos en ganglios linfáticos de drenaje de *db/db* (A-B), DIO (C-D) y ratones de control inmunizados con OVA/CFA se analizaron con respecto a la expresión de IL-22 el día 7 por citometría de flujo. Los números en las representaciones de FACS en (A, C) son el porcentaje de células IL-22+ en linfocitos T CD4+. **(E-F)** A ratones *db/db*, controles delgados, normales alimentados con DAG y dieta de pienso se les inyectó flagelina o PBS. Se recogió suero después de 2 h de ELISA de IL-22 de *db/db* y controles delgados (E), y ratones alimentados con DAG y dieta de pienso (F). Los datos mostrados son representativos de tres (A-B) o dos (C-F) experimentos independientes. N=4 en todos los experimentos. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Barras de error, e.t.m.

La **Figura 45** muestra defectos en la producción de IL-17 e IL-22 en ratones deficientes en señal de leptina. **(A-B)** Se analizó la expresión de IL-17A e IL-22 el día 7 como porcentaje en células CD4+ en ratones *db/db* y *ob/ob* inmunizados con OVA/CFA. (C) ELISA de IL-22 de sobrenadante de cultivo de linfocitos T CD4+ WT no tratados purificados que se estimularon en condiciones productoras de IL-22 con o sin leptina de ratón recombinante (1 µg/ml). (D) ELISA de IL-22 de sobrenadante de cultivo de esplenocitos Rag2 KO estimulados con IL-23 con o sin leptina de ratón recombinante (1 µg/ml). (E) ELISA de IL-22 de suero de *ob/ob* o controles delgados 2 horas después de estimulación con flagelina. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Barras de error, e.t.m.

La **Figura 46** muestra resultados que demuestran que la susceptibilidad de ratones *db/db* (*ob/ob*) a infección por *C. rodentium* estaba asociada a la producción de IL-22 y se rescató por IL-22-Fc exógeno. **(A)** Expresión de ARNm de IL-22 en colonos de ratones WT, *db/db* y *ob/ob* (n=5) después de infección por *C. rodentium*. **(B)** Peso corporal y **(C)** supervivencia de ratones *db/db* y controles delgados (n=10) infectados con *C. rodentium*. **(D-E)** Histología de colon de ratones de control delgados (D) y *db/db* (E) el día 10, que muestra hiperplasia epitelial, desprendimiento de enterocitos a la luz del intestino, colonias bacterianas (flechas) y edema submucoso (barra vertical). Barra horizontal, 200 µm. **(F)** Puntuación clínica determinada por histología de colon (n=5). **(G-H)** Carga bacteriana de ratones *db/db* y controles delgados (n=5) en hígado (G) y bazo (H) el día 10. **(I)** ELISA de IgG anti *C. rodentium* en ratones de control delgados y *db/db* (n=5) el día 10. **(J)** Supervivencia de ratones de control delgados y *db/db* (n=10) tratados con IL-22-Fc o IgG de control después de infección. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Barras de error, e.t.m.

La **Figura 47** muestra resultados que demuestran que los trastornos diabéticos se redujeron por el tratamiento con IL-22-Fc. **(A-D)** Se trataron ratones alimentados con DAG con IL-22-Fc dos veces por semana (n=10). **(A)** Glucosa en sangre el día 20 (alimentados) y el día 21 (16 horas de ayuno). **(B)** Peso corporal el día 30. **(C)** Ensayo de tolerancia a la glucosa el día 21. **(D)** Ensayo de tolerancia a la insulina el día 28. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Barras de error, e.t.m.

La **Figura 48** muestra resultados que demuestran que IL-22 previene los trastornos diabéticos de ratones alimentados con DAG. **(A)** peso corporal, **(B)** glucosa en sangre, **(C)** ensayo de tolerancia a la glucosa el día 23, **(D)** glucosa en sangre el día 23 después de 16 h de ayuno, y **(E)** panículo adiposo abdominal el día 25. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Barras de error, e.t.m.

La **Figura 49** muestra resultados que demuestran que IL-22 regula el síndrome metabólico mediante múltiples mecanismos. **(A-C)** Se alimentó a dos grupos de ratones *db/db* (n=8) con alimento a voluntad y se les trató con IgG de control o IL-22-Fc dos veces por semana. Se alimentó a un grupo de ratones *db/db* (n=8) con alimento restringido que coincidía con el consumo de alimento del grupo tratado con IL-22-Fc y se trató con IgG de control. Se muestra el consumo de alimento acumulado de los primeros ocho días de ratones alimentados a voluntad en (A), glucosa en sangre en (B) y ensayo de tolerancia a la glucosa el día 25 en (C). **(D-E)** muestran niveles de PYY en ratones *db/db* (D) y DAG (E) tratados con IL-22-Fc o IgG de control el día 0 y día 2. Se recogió suero el día 2 antes del 2º tratamiento y el día 5, y se analizó con respecto a PYY. **(F)** muestra LPS en suero de ratones *db/db* tratados con IL-22-Fc o IgG de control durante 3 semanas. **(G-I)** se alimentaron ratones IL-22R KO (n=9) y WT (n=6) con DAG a las 6 semanas de edad. Los resultados de peso corporal se muestran en (G), se muestran resultados del ensayo de tolerancia a la glucosa a los 3 meses con DAG en (H) y resultados del ensayo de tolerancia a la insulina a los 4 meses con DAG en (I). Los datos mostrados son representativos de dos (A-C) o tres (D-I) experimentos independientes. \* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Barras de error, e.t.m.

La **Figura 50** muestra resultados de consumo de alimentos restringido a alimentación por pares. Se alimentaron tres grupos de ratones *db/db* y se trataron como en la Figura 49A. Se midió el consumo de alimento acumulado.

La **Figura 51** muestra resultados que demuestran función hepática mejorada y panículo adiposo reducido por IL-22. **(A)** ratones *db/db* tratados con IL-22 Fc o IgG de control como en la Figura 20A. Las enzimas hepáticas se midieron al cabo de un mes. **(B-C)** Se trataron ratones alimentados con DAG con IL-22 Fc o IgG de control como en la Figura 47A. Se midieron las enzimas hepáticas (B) y el panículo adiposo abdominal (C) al cabo de un mes. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Barras de error, e.t.m. **(D-H)** los ratones se alimentaron con DAG durante 10 semanas, y después se trataron con IL-22 Fc o control dos veces por semana durante 6 semanas. **(D)** Expresión de genes metabólicos de lípidos de tejido adiposo blanco. **(E)** Triglicérido, glicerol y ácidos grasos libres en suero. **(F)** Triglicérido hepático. **(G)** Colesterol hepático. **(H)** Triglicérido de tejido adiposo blanco. **(I-J)** ratones *db/db* tratados con IL-22 Fc o IgG de control durante 4 semanas. **(I)** Triglicérido hepático. **(J)** Triglicérido de tejido adiposo blanco. \*P<0,05. Barras de error, e.t.m.

La **Figura 52** muestra resultados que demuestran que IL-22 aumentó la secreción de insulina de células β. Se trataron ratones *db/db* con IL-22 Fc como en la Figura 20A, se recogieron los páncreas el día 30 y se tiñeron con

respecto a insulina y glucagón. (A) Porcentaje de área de islote en el área de páncreas total. (B) Porcentaje de área de células  $\beta$  en el área de islote total. (C) Porcentaje de área de células  $\alpha$  en el área de islote total.

**Figura 53** Los ratones IL-22 KO no desarrollaron intolerancia a la glucosa con DAG. Se alimentaron ratones IL-22 con DAG comenzando a las 6 semanas de edad. Se realizó ensayo de tolerancia a la glucosa 3 meses después de DAG. Barras de error, e.t.m.

La **Figura 54** muestra resultados que demuestran la susceptibilidad de ratones *ob/ob* a infección por *C. rodentium*: (A) peso corporal y (B) supervivencia de ratones *ob/ob* y delgados ( $n=10$ ) infectados con *C. rodentium*; (C-D) histología de colon de ratones de control delgados (C) y *ob/ob* (D) el día 8, que muestra hiperplasia epitelial, desprendimiento de enterocitos a la luz del intestino, colonias bacterianas (flechas) y edema submucoso (barra vertical) (barra horizontal, 200  $\mu$ m); (E) puntuación clínica determinada por histología de colon ( $n=5$ ); y (F-G) carga bacteriana de ratones *ob/ob* y controles delgados ( $n=5$ ) en hígado (F) y bazo (G) el día 8. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Barras de error, e.t.m.

La **Figura 55** muestra resultados de ratones *db/db* tratados con IL-22 Fc, IL-20 Fc o IL-24 Fc en (A) el peso corporal, (B) la glucosa en suero y (C) el ensayo de tolerancia a la glucosa el día 20 de tratamiento.

Las **Figuras 56A y B** muestran resultados de la comparación de la eficacia de curación de heridas en ratones *db/db* tratados con VEGF o IL-22 Fc.

Las **Figuras 57A-E** muestran inducción de citocinas o quimiocinas por IL-22 Fc en epidermis reconstituida.

La **Figura 58** muestra resultados que comparan el cierre de heridas usando un modelo de herida entablillada en ratones de tipo silvestre y *db/db* con o sin infección por *S. aureus*.

Las **Figuras 59 A y B** muestran resultados que comparan la eficacia de curación de heridas entre VEGF e IL-22 Fc en un modelo de herida infectada entablillada.

La **Figura 60** muestra resultados que comparan la eficacia de curación de heridas entre VEGF y IL-22 Fc a diferentes concentraciones en un modelo de herida infectada entablillada.

La **Figura 61** muestra resultados que comparan la eficacia de curación de heridas entre VEGF, PDGF e IL-22 Fc a diferentes concentraciones en un modelo de curación de herida infectada entablillada.

La **Figura 62** muestra que IL-22 Fc aceleró la curación de herida en una solución así como en una formulación en gel en un modelo de curación de herida entablillada.

#### Descripción detallada de realizaciones de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a la proteína IL-22 o proteínas de fusión de IL-22 Fc, composición que las comprende y métodos de uso de las mismas. En particular, la invención se refiere al uso de proteínas de fusión de IL-22 Fc o polipéptido de IL-22 en la prevención y el tratamiento de la EII, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y afecciones caracterizadas por la formación de placas ateroscleróticas, síndrome metabólico, endotoxemia leve y aguda y septicemia, lesión renal aguda, pancreatitis aguda, pancreatitis aguda moderada y trastornos relacionados con la insulina. Además, la invención se refiere al uso de proteínas de fusión de IL-22 Fc o polipéptidos de IL-22 en la prevención y el tratamiento de la úlcera de pie diabético, la aceleración de la curación de heridas y en particular la curación de heridas diabéticas.

En un aspecto, se cree que esta es la primera divulgación que muestra el tratamiento por polipéptido de IL-22 de enfermedad cardiovascular en sí misma. Los datos del presente documento apoyan la idea de que un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc puede reducir el crecimiento de placas ateroscleróticas, reducir la frecuencia de ruptura de placas ateroscleróticas y reducir la endotoxemia. Esta invención es particularmente útil para tratar sujetos que padecen síndrome metabólico, endotoxemia leve o aguda, septicemia y trastornos relacionados con la insulina, tales como resistencia a la insulina (insensible a la insulina) que necesitan un cambio en su perfil lipídico de HDL/LDL, como puede determinar un médico o especialista clínico. La solicitud muestra datos que indican que el polipéptido de IL-22 o la proteína de fusión de IL-22 Fc puede aumentar las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y reducir las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en los sujetos que padecen síndrome metabólico. Los datos, sin quedar ligado a la teoría, también indican el LPS derivado del intestino como un impulsor detrás de la endotoxemia y la aterosclerosis. Los ratones tratados con proteína de fusión de mIL-22 Fc tuvieron hiperlipidemia reducida, tolerancia a la glucosa mejorada con función vascular restaurada y estos cambios culminaron en una reducción de la placa aterosclerótica. El polipéptido de IL-22 o la proteína de fusión de IL-22 Fc pueden atenuar la progresión de enfermedad cardiovascular.

Además, la diabetes es un trastorno crónico que afecta al metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en animales. La diabetes es la principal causa de ceguera, insuficiencia renal y amputaciones de las extremidades inferiores en adultos y es un factor de riesgo importante para enfermedad cardiovascular e ictus. La diabetes mellitus de tipo I (o diabetes mellitus insulino dependiente ("DMID")) o diabetes de aparición juvenil comprende aproximadamente el 10 % de todos los casos de diabetes. La enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de función secretora de insulina por células beta del páncreas. Esta característica también es compartida por la diabetes no idiopática, o "secundaria", que tiene sus orígenes en la enfermedad pancreática. La diabetes mellitus de tipo I se asocia con las siguientes señales clínicas o síntomas, por ejemplo, concentración de glucosa en plasma elevada de forma persistente o hiperglucemia; poliuria; polidipsia y/o hiperfagia; complicaciones microvasculares crónicas tales como retinopatía, nefropatía y neuropatía; y complicaciones macrovasculares tales como hiperlipidemia e hipertensión que pueden conducir a ceguera, enfermedad renal de estadio final, amputación de las extremidades e infarto de miocardio.

La diabetes mellitus de tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente o DMNID, también denominada diabetes de tipo II) es un trastorno metabólico (o síndrome metabólico) que implica la desregulación del metabolismo de la glucosa y alteración de la sensibilidad a la insulina. La diabetes mellitus de tipo II habitualmente se desarrolla en la adultez y se asocia con la incapacidad del cuerpo para utilizar o fabricar suficiente insulina. Además de la resistencia a la insulina observada en los tejidos diana, los pacientes que padece diabetes mellitus de tipo II tienen una deficiencia de insulina relativa, es decir, los pacientes tienen niveles de insulina menores de los predicho para una concentración de glucosa en plasma dada. La diabetes mellitus de tipo II se caracteriza por las siguientes señales clínicas o síntomas, por ejemplo, concentración de glucosa en plasma elevada de forma persistente o hiperglucemia; poliuria; polidipsia y/o hiperfagia; complicaciones microvasculares crónicas tales como retinopatía, nefropatía y neuropatía; y complicaciones macrovasculares tales como hiperlipidemia e hipertensión que pueden conducir a ceguera, enfermedad renal de estadio final, amputación de las extremidades e infarto de miocardio.

## I. DEFINICIONES

A menos que se definan de otro modo, se entiende que todas las expresiones de la técnica, notaciones y otra terminología científica usada en el presente documento tienen los significados habitualmente entendidos por los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. En algunos casos, se definen en el presente documento expresiones con significados habitualmente entendidos para mayor claridad y/o fácil referencia, y no debería interpretarse necesariamente que la inclusión de dichas definiciones en el presente documento represente una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende en general en la técnica.

En la presente solicitud, a menos que se indique otra cosa, las técnicas utilizadas se pueden encontrar en cualquiera de varias referencias bien conocidas, tales como: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, *et al.* 1990. Academic Press, San Diego, CA), y Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual c. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado se llevan a cabo en general de acuerdo con los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a menos que se indique otra cosa. Antes de describir los presentes métodos y usos de los mismos, debe entenderse que la presente invención no está limitada a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las especies o géneros animales, las construcciones y los reactivos particulares descritos, ya que estos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la referencia a "un polipéptido aislado" significa uno o más péptidos aislados.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

La expresión "proteína de fusión de IL-22 Fc" o "proteína de fusión de IL-22" o "proteína de fusión de IL-22 Ig" como se usan en el presente documento se refieren a una proteína de fusión en la que una proteína o un polipéptido de IL-22 está unido, directa o indirectamente, con una región Fc IgG. En determinadas realizaciones preferidas, la proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención comprende una proteína o un polipéptido de IL-22 humano unido a una región Fc IgG humana. En determinadas realizaciones, la proteína de IL-22 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. Sin embargo, se entiende que variaciones de secuencia tales como inserciones, supresiones, sustituciones, especialmente sustituciones de aminoácidos conservativas de IL-22 o Fc que no afectan a la función y/o actividad de IL-22 o proteína de fusión de IL-22 Fc también son contempladas por la invención. La proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención puede unirse con receptor de IL-22, que puede conducir a señalización corriente abajo del receptor de IL-22. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc es capaz de unirse con el receptor de IL-22 y/o es capaz de conducir a señalización corriente abajo del receptor de IL-22. Las funciones y/o actividades de la proteína de fusión de IL-22 Fc pueden ensayarse mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación, ELISA, ensayo de unión de receptor-ligando y ensayo de luciferasa de Stat3. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc que se une con el receptor de IL-22, la unión puede conducir a señalización corriente abajo del receptor de IL-22, comprendiendo dicha proteína de fusión de IL-22 Fc una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14, y en donde la región Fc no está glucosilada. En determinadas realizaciones particulares, la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 no posee actividades efectoras (por ejemplo, no se une con FcγIIIIR) o muestra actividad efectora sustancialmente menor que un anticuerpo IgG completo (por ejemplo, de tipo silvestre). En otras realizaciones determinadas, la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc no desencadena citotoxicidad tal como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad

dependiente de complemento (CDC). A menos que se especifique de otro modo, "proteína de fusión de IL-22", "proteína de fusión de IL-22 Fc", "proteína de fusión de IL-22 Ig", "proteína de fusión de IL-22 Fc" o "IL-22 Fc" se usan indistintamente a lo largo de la presente solicitud.

5 La expresión "IL-22" o "polipéptido de IL-22" o "proteína de IL-22" como se usan en el presente documento, se refiere en general a cualquier IL-22 nativo de cualquier fuente de mamífero, incluyendo primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. La expresión abarca IL-22 sin procesar, de "longitud completa", así como cualquier forma de IL-22 que resulte de procesamiento en la célula. Por ejemplo, tanto IL-22 de longitud completa que contiene la secuencia líder N terminal como la IL-22 de forma madura están abarcadas por la presente invención. La secuencia líder (o el péptido señal) puede ser la secuencia líder de IL-22 endógena o una secuencia líder exógena de otra proteína secretora de mamífero. En determinadas realizaciones, la secuencia líder puede ser de una proteína secretora eucariota o procariota. La expresión también abarca variantes de origen natural de IL-22, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una IL-22 humana a modo de ejemplo se muestra en la SEQ ID NO: 4 (forma madura, sin un péptido señal). En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la proteína de IL-22 de longitud completa con la secuencia líder endógena se proporciona en la SEQ ID NO: 71; mientras que en otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la proteína de IL-22 madura con una secuencia líder exógena se proporciona en la SEQ ID NO: 2. Variaciones menores de secuencia especialmente sustituciones de aminoácidos conservativas de IL-22 que no afectan a la función y/o actividad de IL-22 (por ejemplo, unión al receptor de IL-22) también son contempladas por la invención. La Figura 1 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de IL-22 madura de varias especies de mamíferos a modo de ejemplo. Los asteriscos indican restos de aminoácidos altamente conservados entre especies que son probablemente importantes para las funciones y/o actividades de IL-22. En consecuencia, en determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención comprende un polipéptido de IL-22 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4. En otras realizaciones determinadas, la proteína de IL-22 tiene 95 % o más identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 71, 96 % o más identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 71, 97 % o más identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 71; 98 % o más identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 71; 99 % o más identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 71. Los polipéptidos de IL-22 descritos en el presente documento pueden aislarse de diversas fuentes, tal como de tejido humano o de otra fuente, o prepararse por métodos recombinantes o sintéticos.

La expresión "receptor de IL-22" o "IL-22R" se refiere a un heterodímero que consiste en IL-22R1 e IL-10R2 o variantes alélicas de origen natural de los mismos. Véase Ouyang *et al.*, 2011, Annu. Rev. Immunol. 29:159-63. IL-10R2 es expresado de forma ubicua por muchos tipos celulares e IL-22R1 se expresa solamente en células innatas tales como células epiteliales, hepatocitos y queratinocitos. IL-22R1 también se conoce como IL-22Ra1 o IL-22Rα1. IL-22R1 puede emparejarse con otros polipéptidos para formar receptores heterodiméricos para otros miembros de la familia de IL-10, por ejemplo IL-20 o IL-24. Véase, por ejemplo, Ouyang *et al.*, 2011, mencionado anteriormente.

Un "polipéptido de IL-22 de secuencia nativa" o un "polipéptido de IL-22R de secuencia nativa" se refiere a un polipéptido que comprende la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido de IL-22 o IL-22R correspondiente obtenido de la naturaleza. Dichos polipéptidos de IL-22 o IL-22R de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. Las expresiones abarcan específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido de IL-22 o IL-22R específico (por ejemplo, un IL-22 que carece de su péptido señal asociado), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas con corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. En diversas realizaciones de la invención, los polipéptidos de IL-22 o IL-22R de secuencia nativa desvelados en el presente documento son polipéptidos de secuencia nativa madura o de longitud completa. Se muestra una IL-22 humana nativa de longitud completa a modo de ejemplo en la Figura 30 (ADN, SEQ ID NO: 70) y la Figura 31 (proteína, SEQ ID NO: 71). Los codones de inicio y terminación se muestran en fuente en negrita y subrayada en la Figura 30. Aunque se muestra que las secuencias polipeptídicas de IL-22 e IL-22R desveladas en las figuras adjuntas comienzan con restos de metionina designados en el presente documento posición de aminoácido 1, es concebible y posible que puedan emplearse otros restos de metionina localizados cadena arriba o cadena abajo de la posición de aminoácido 1 en las figuras como el resto de aminoácido de partida para los polipéptidos de IL-22 o IL-22R.

Una "variante de IL-22", una "variante de IL-22R", un "polipéptido variante de IL-22", o un "polipéptido variante de IL-22R" significa un polipéptido de IL-22 o IL-22R como se ha definido anteriormente que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una polipeptídica de IL-22 o IL-22R de secuencia nativa de longitud completa. Generalmente, una variante polipeptídica de IL-22 o IL-22R tendrá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 89 % de identidad de secuencia de

aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y como alternativa al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia polipeptídica de IL-22 o IL-22R de secuencia nativa de longitud completa o madura.

La expresión "región Fc", "dominio Fc" o "Fc" se refiere a una región no de unión a antígeno C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc nativas y regiones Fc variantes. En determinadas realizaciones, una región Fc de cadena pesada IgG humana se extiende desde Cys226 hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no, sin afectar a la estructura o estabilidad de la región Fc. A menos que se especifique otra cosa en el presente documento, la numeración de restos de aminoácidos en la región IgG o Fc se según el sistema de numeración de EU para anticuerpos, también denominado el índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

En determinadas realizaciones, la región Fc se refiere a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina IgG que comprende una región de bisagra (que comienza en Cys226), un dominio CH2 de IgG y dominio CH3. La expresión "región de bisagra" o "secuencia de bisagra" como se usa en el presente documento se refiere a la secuencia de aminoácidos localizada entre el enlazador y el dominio CH2. En determinadas realizaciones, la región de bisagra comprende la secuencia de aminoácidos CPPCP (SEQ ID NO: 31). En determinadas realizaciones, la región de bisagra para proteína de fusión de IL-22 Fc IgG4 comprende la secuencia CPPCP (SEQ ID NO: 31), una secuencia hallada en la región de bisagra de IgG1 nativa, para facilitar la dimerización. En otras realizaciones determinadas, la región Fc comienza en la región bisagra y se extiende al extremo C terminal de la cadena pesada de IgG. En determinadas realizaciones particulares, la región Fc comprende la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanos. En determinadas realizaciones particulares, la región Fc comprende el dominio CH2 y CH3 de IgG4. En otras realizaciones particulares determinadas, la región Fc comprende el dominio CH2 y CH3 de IgG1. Como se describe en la sección de ejemplos, los solicitantes descubrieron inesperadamente que la proteína de fusión de IL-22 Fc IgG4 mostraba propiedades farmacocinéticas incluso superiores a la proteína de fusión de IL-22 Fc IgG1.

En determinadas realizaciones, el dominio CH2 de IgG comienza en Ala 231. En otras realizaciones determinadas, el dominio CH3 comienza en Glu 341. Se entiende que el resto de Lys C terminal de IgG humano puede estar opcionalmente ausente. También se entiende que se contemplan dentro del alcance de la invención sustituciones de aminoácidos conservativas de la región Fc sin afectar a la estructura deseada y/o estabilidad de Fc.

En determinadas realizaciones, la IL-22 se une a la región Fc mediante un enlazador. En determinadas realizaciones particulares, el enlazador es un péptido que conecta el extremo C terminal de IL-22 con la región Fc como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, están presentes secuencias de IgG nativas en el enlazador y/o la región de bisagra para minimizar y/o evitar el riesgo de inmunogenicidad. En otras realizaciones, pueden introducirse variaciones de secuencia menores en las secuencias nativas para facilitar la fabricación. También están dentro del alcance de la invención construcciones de fusión de IL-22 Fc que comprenden secuencias de enlazador o bisagra que muestran alta actividad (como se mide, por ejemplo, por un ensayo de luciferasa). En determinadas realizaciones, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos que es de 8-20 aminoácidos, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 10-11, 10-12, 10-13, 10-14, 10-15, 10-16, 11-16, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones determinadas, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos DKTHT (SEQ ID NO: 32).

En determinadas realizaciones particulares, el enlazador no comprende la secuencia Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 45), Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 46) o Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 47).

En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende un polipéptido de IL-22 ligado a una región Fc por un enlazador. La expresión "ligado a" o "fusionado con" se refiere a un enlace covalente, por ejemplo, un enlace peptídico, formado entre dos restos.

El término "afucosilación", "afucosilado", "desfucosilación" o "desfucosilado" se refiere a la ausencia o retirada de fucosa central del N glucano unido al dominio CH2 de Fc.

Los solicitantes descubrieron inesperadamente que las proteínas de fusión de IL-22 Fc IgG1, a diferencia de otras proteínas de fusión de Fc o anticuerpos que comprenden Fc, mostraban altos niveles (por ejemplo, 30 %) de afucosilación en los N glucanos unidos a la región Fc. Los N glucanos unidos al dominio CH2 de Fc son heterogéneos. Los anticuerpos o proteínas de fusión de Fc generados en células CHO son afucosilados por

actividad fucosiltransferasa. Véase Shoji-Hosaka *et al.*, J. Biochem. 2006, 140:777-83. Normalmente, puede detectarse un pequeño porcentaje de IgG afucosilados de origen natural en suero humano. La N glucosilación del Fc es importante para la unión con FcγR; y la afucosilación del N glucano aumenta la capacidad de unión del Fc con FcγRIIIa. El aumento de la unión con FcγRIIIa puede potenciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), lo que puede ser ventajoso en determinadas aplicaciones terapéuticas en las que la citotoxicidad es deseable. Véase Shoji-Hosaka *et al.*, mencionado anteriormente. Dicha función efectora potenciada, sin embargo, puede ser perjudicial cuando la citotoxicidad mediada por Fc es indeseable tal como en el caso de fusión de IL-22 Fc.

Se sabe que Fc IgG4 muestra menos actividad efectora que Fc IgG1. Los solicitantes descubrieron inesperadamente que la proteína de fusión de IL-22 Fc IgG4 también mostraba altos niveles de afucosilación en la región Fc. El alto nivel de N glucano afucosilado unido al Fc de IgG4 puede aumentar la actividad efectora indeseable.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc en la que la región Fc o el dominio CH2 no está glucosilado. En determinadas realizaciones, el sitio de N glucosilación en el dominio CH2 se muta para evitar la glucosilación.

En otras realizaciones determinadas, la glucosilación en el dominio CH2 de la región Fc puede eliminarse alterando el sitio consenso de glucosilación, es decir, Asn en la posición 297 seguido de cualquier resto de aminoácido (en el caso de IgG humano, Ser) y Thr (véase la Figura 3). El sitio de glucosilación puede alterarse mediante inserciones, supresiones y/o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, pueden insertarse uno o más restos de aminoácidos entre Asn y Ser o entre Ser y Thr para alterar el sitio de glucosilación original, en donde las inserciones no regeneran un sitio de N glucosilación. En determinadas realizaciones particulares, el resto N297 (por ejemplo, el sitio N glucosilado en Fc, véase la Figura 3) en el dominio CH2 de Fc IgG humano se muta para anular el sitio de glucosilación. En determinadas realizaciones particulares, el resto N297 se cambia a Gly, Ala, Gln, Asp o Glu. En algunas realizaciones particulares, el resto N297 se cambia a Gly o Ala. En otras realizaciones particulares, el resto N297 se cambia a Gly. En otras realizaciones determinadas, el resto T299 puede sustituirse con otro aminoácido, por ejemplo Ala, Val o Gly. En determinadas realizaciones particulares, las mutaciones que dan como resultado un Fc afucosilado no afectan a la estructura y/o estabilidad de la proteína de fusión de IL-22 Fc.

Se describen en el presente documento métodos para tratar la EII, incluyendo CU y EC, métodos para inhibir la infección bacteriana en el intestino y métodos para mejorar la integridad epitelial, la proliferación epitelial, la diferenciación y/o migración en el intestino, y métodos para tratar trastornos metabólicos o síndrome metabólico, diabetes de tipo II, aterosclerosis y curación de herida diabética en un paciente que lo necesite que comprenden administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc en donde la región Fc no está glucosilada.

También se describe en el presente documento una composición que comprende proteínas de fusión de IL-22 Fc que tienen bajo nivel de o ninguna afucosilación en la región Fc. Específicamente, la invención proporciona una composición que comprende proteínas de fusión de IL-22 Fc que tienen un nivel de afucosilación general en la región Fc de no más del 10 %, preferentemente no más del 5 %, más preferentemente no más del 2 % y más preferentemente menos del 1 %.

Se describen métodos para tratar la EII, incluyendo CU y EC, métodos para inhibir la infección bacteriana en el intestino y métodos para mejorar la integridad epitelial, la proliferación epitelial, la diferenciación y/o migración en el intestino, y métodos para tratar trastornos metabólicos, diabetes de tipo II, diabetes de tipo II con obesidad mórbida, enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, endotoxemia (aguda y leve), septicemia, cardiopatía coronaria aguda, hipertensión, dislipidemia, obesidad, hiperglucemia, trastornos del metabolismo de lípidos, hepatitis, hepatitis aguda, insuficiencia renal, insuficiencia renal aguda, lesión renal aguda, fallo de injerto renal, pancreatitis, pancreatitis aguda, fibrosis hepática y fibrosis pulmonar, herida, herida infectada, aceleración de la curación de heridas, incluyendo la curación de heridas diabéticas, en un paciente que lo necesite que comprenden administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende proteínas de fusión de IL-22 Fc que tienen un nivel de afucosilación en la región Fc de no más del 10 %, preferentemente no más del 5 %, más preferentemente no más del 2 % y más preferentemente menos del 1 %.

La expresión "% de afucosilación" se refiere al nivel de afucosilación en la región Fc en una composición de proteínas de fusión de IL-22 Fc. El % de afucosilación puede medirse mediante espectrometría de masas (EM) y presentarse como el porcentaje de especies de glucanos afucosilados (especies sin la fucosa en un dominio Fc (menos 1) y en ambos dominios Fc (menos 2) combinados) sobre la población completa de proteínas de fusión de IL-22 Fc. Por ejemplo, puede calcularse el % de afucosilación como el porcentaje del área combinada bajo el pico de fucosa menos 1 y pico de fucosa menos 2 sobre el área total de todas las especies de glucano analizadas por EM, tal como se determina por un espectrómetro de masas TOF 6520B Agilent como se describe en la Figura 2 y en los ejemplos mostrados posteriormente. El nivel de afucosilación puede medirse por cualquier otro método adecuado conocido en la técnica, incluyendo sin limitación EM HPLC-Chip Cube (Agilent) y HPLC de fase inversa. El % de afucosilación de composición de IL-22 Fc puede usarse como una indicación para determinar si la composición probablemente desencadene un nivel inaceptable de ADCC, inadecuado para los fines pretendidos. En consecuencia, en determinados casos particulares, la composición comprende proteínas de fusión de IL-22 Fc que

tienen un nivel de afucosilación de no más del 10 %, preferentemente no más del 5 %, más preferentemente no más del 3 % y más preferentemente menos del 1 %. En determinadas realizaciones, la composición comprende proteínas de fusión de IL-22 Fc que tienen un nivel de afucosilación de no más del 10 %, no más del 9 %, no más del 8 %, no más del 7 %, no más del 6 %, no más del 5 %, no más del 4 %, no más del 3 %, no más del 2 % o no más del 1 %.

El nivel deseado de afucosilación de una composición de IL-22 Fc puede conseguirse mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación, por purificación. Por ejemplo, la especie fucosilada en una composición puede enriquecerse por cromatografía de afinidad que tiene resinas conjugadas con un resto de unión a fucosa, tal como un anticuerpo o lectina específicos para fucosa, especialmente fucosa presente en el enlace 1-6. Véase, por ejemplo, Kobayashi *et al*, 2012, J. Biol. Chem. 287:33973-82. La especie fucosilada también puede enriquecerse y separarse de especies afucosiladas usando un anticuerpo específico antifucosa en una columna de afinidad. Como alternativa o adicionalmente, las especies afucosiladas pueden separarse de especies fucosiladas basándose en la afinidad de unión diferencial por FcyRIIIa usando cromatografía de afinidad.

En otras realizaciones determinadas, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende una región Fc en la que el resto N297 en el dominio CH2 está mutado. En determinadas realizaciones, el resto N297 se cambia a Gly o Ala, preferentemente a Gly. En otras realizaciones determinadas, el resto N297 se suprime. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende un Fc que tiene una sustitución de aminoácidos en N297 está aglucosilada o no glucosilada. El término "aglucosilado" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína o una parte de una proteína de interés que no está glucosilada. Por ejemplo, una proteína de fusión de IL-22 Fc con una región Fc aglucosilada puede realizarse mutando el resto N297 en el dominio CH2 de la región Fc.

En otras realizaciones, el N glucano unido al resto N297 de tipo silvestre puede retirarse enzimáticamente, por ejemplo, por desglucosilación. Las enzimas glucolíticas adecuadas incluyen sin limitación, péptido-N-glucosidasa (PNGasa).

La expresión "proteína de fusión de IL-22 Fc dimérica" se refiere a un dímero en el que cada monómero comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc. La expresión "proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica" se refiere a un dímero en el que un monómero comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc (la rama Fc de IL-22), mientras que el otro monómero comprende una región Fc sin el polipéptido de IL-22 (la rama Fc). En consecuencia, la proteína de fusión de IL-22 Fc dimérica es bivalente con respecto a la unión con IL-22R, mientras que la proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica es monovalente con respecto a unión con IL-22R. La heterodimerización de la proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica puede facilitarse mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación, heterodimerización por la tecnología de botón en ojal. La estructura y el método de ensamblaje de la tecnología de botón en ojal puede encontrarse en, por ejemplo, los documentos US5.821.333, US7.642.228, US 2011/0287009 y PCT/US2012/059810,

Esta tecnología se desarrolló introduciendo un "botón" (o una protuberancia) reemplazando un resto de aminoácido pequeño con uno grande en el dominio CH3 de un Fc, e introduciendo un "ojal" (o una cavidad) en el dominio CH3 del otro Fc reemplazando uno o más restos de aminoácidos grandes con restos más pequeños. La rama de fusión de IL-22 Fc puede comprender un botón, y la rama de solamente Fc comprende un ojal.

Los restos preferidos para la formación de un botón son en general restos de aminoácidos de origen natural y se seleccionan preferentemente de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). Se prefieren más triptófano y tirosina. El resto original para la formación del botón puede tener un volumen de cadena lateral pequeño, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo en el dominio CH3 para formar el botón incluyen sin limitación la sustitución T366W, T366Y o F405W.

Los restos preferidos para la formación de un ojal son habitualmente restos de aminoácidos de origen natural y se seleccionan preferentemente de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V). El resto original para la formación del ojal puede tener un volumen de cadena lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo en el dominio CH3 para generar el ojal incluyen sin limitación las sustituciones T366S, L368A, F405A, Y407A, Y407T e Y407V. En determinados casos, el botón comprende sustitución T366W y el ojal comprende las sustituciones T366S/L368A/Y407V. En determinadas realizaciones particulares, la región Fc de la proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica comprende una región Fc IgG1. En determinados casos particulares, la fusión de IL-22 Fc IgG1 monomérica comprende una rama de botón de IL-22 Fc y una rama de ojal de Fc. En determinadas realizaciones, la rama de botón de IL-22 Fc comprende una sustitución T366W (SEQ ID NO: 61) y la rama de ojal de Fc comprende T366S, L368A y Y407V (SEQ ID NO: 62). En otros casos determinados, la región Fc de ambas ramas comprende además una mutación N297G o N297A. En determinados casos, la proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica se expresa en células de *E. coli*.

El término "herida" se refiere a una lesión, especialmente una en la que la piel u otra superficie externa se desgarrar, se perfora, se corta o se rompe de otro modo.

El término "úlceras" es un sitio de daño a la piel o membrana mucosa que se caracteriza con frecuencia por la formación de pus, muerte de tejido y está acompañado con frecuencia por una reacción inflamatoria.

El término "intestino" como se usa en el presente documento abarca en general el intestino delgado y el intestino grueso.

La expresión "acelerar la curación de heridas" o "aceleración de la curación de heridas" se refiere al aumento de la velocidad de curación, por ejemplo, una reducción del tiempo hasta que se produce el cierre de herida completo o una reducción del tiempo hasta que se produce un % de reducción del área de herida.

Una "herida diabética" es una herida que está asociada con la diabetes.

Una "úlceras diabética" es una úlcera que está asociada con la diabetes.

Una "herida crónica" se refiere a una herida que no se cura. Véase, por ejemplo, Lazarus *et al.*, Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994). Las heridas crónicas incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, úlceras arteriales, úlceras diabéticas, úlceras de presión o úlceras de decúbito, úlceras venosas, etc. Una herida aguda puede convertirse en una herida crónica. Las heridas agudas incluyen, pero sin limitación, heridas causadas por, por ejemplo, lesión térmica (por ejemplo, quemadura), traumatismo, cirugía, escisión de cáncer de piel extensivo, infecciones bacterianas y fúngicas profundas, vasculitis, esclerodermia, pénfigo, necrólisis epidérmica tóxica, etc. Véase, por ejemplo, Buford, Wound Healing and Pressure Sores, Healing-Well.com, publicado el: 24 de octubre de 2001. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, una herida crónica es una herida infectada. Una "herida normal" se refiere a una herida que experimenta reparación de curación de heridas normal.

Un "marco conservado humano aceptor" para los fines del presente documento es un marco conservado que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco conservado de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco conservado de dominio variable de cadena pesada (VH) obtenida de un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano, como se define posteriormente. Un marco conservado humano aceptor "obtenido de" un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo o puede contener cambios de secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas realizaciones, el marco conservado humano aceptor VL es idéntico en su secuencia a la secuencia de marco conservado de inmunoglobulina humana VL o secuencia de marco conservado consenso humano.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión a antígeno de una molécula (por ejemplo, un ligando o un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un receptor o un antígeno). A menos que se indique otra cosa, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, proteína de fusión de IL-22 Fc y receptor de IL-22). La afinidad de una molécula X por su compañera Y puede representarse en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Se describen realizaciones ilustrativas y a modo de ejemplo específicas para medir la afinidad de unión a continuación.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo pero sin limitación anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une con el antígeno con el que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen pero sin limitación Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" como un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en 50 % o más y, por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo con su antígeno en un ensayo de competición en 50 % o más. Se proporciona en el presente documento un ensayo de competición a modo de ejemplo.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en que una parte de la cadena pesada y/o ligera se obtiene de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se obtiene de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena

pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden además dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos analizados posteriormente.

Las "funciones efectoras" o "actividades efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc no muestra ninguna función efectora o ninguna función efectora detectable. En otras realizaciones determinadas, la proteína de fusión de IL-22 Fc muestra función efectora sustancialmente reducida, por ejemplo, función efectora reducida en aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Por ejemplo, en el caso de una enfermedad o afección cardiovascular, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de IL-22, la proteína de fusión o el agonista puede reducir el grado de formación de placas ateroscleróticas; reducir el tamaño de la placa o las placas ateroscleróticas; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la placa aterosclerótica; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la trombosis o ruptura de una placa aterosclerótica; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad o afección.

Por "reducir o inhibir" se entiende la capacidad de provocar una reducción general preferentemente del 20 % o más, más preferentemente del 50 % o más y más preferentemente del 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. Reducir o inhibir puede referirse al tratamiento de los síntomas del trastorno, la presencia o el tamaño de placas ateroscleróticas o el número de placas ateroscleróticas.

Una "cantidad subóptima" se refiere a la cantidad menor que la cantidad óptima de un agente terapéutico normalmente usado para un tratamiento determinado. Cuando se proporcionan dos agentes terapéuticos a un sujeto, bien simultánea o bien secuencialmente, cada agente terapéutico puede proporcionarse a una cantidad subóptima en comparación con el tratamiento cuando cada agente terapéutico se proporciona solo. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, al sujeto que necesita tratamiento de EII se administra la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención y una dexametasona a una cantidad subóptima.

"Marco conservado" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento indistintamente para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativa o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora" y "cultivo de células hospedadoras" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La célula transformada incluye célula transformada de forma transitoria o de forma estable. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula parental, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se explora o selecciona en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora se transfecta de forma transitoria con el ácido nucleico exógeno. En otras realizaciones

determinadas, la célula hospedadora se transfecta de forma estable con el ácido nucleico exógeno.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana u obtenida de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

Un "marco conservado consenso humano" es un marco conservado que representa los restos de aminoácidos que aparecen de forma más habitual en una selección de secuencias de marco conservado VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, publicación de NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una realización, para el VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, para el VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo obtenida de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha experimentado humanización.

La expresión "región hipervariable" o "HVR" como se usa en el presente documento se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en su secuencia ("regiones determinantes de complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los restos de contacto con antígeno ("antígenos de contacto"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR a modo de ejemplo en el presente documento incluyen:

(a) bucles hipervariables que aparecen en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol 196:901-917 (1987));

(b) CDR que aparecen en los restos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) contactos de antígeno que aparecen en los restos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.* J. Mol. Biol 262: 732-745 (1996)); y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los restos de aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique otra cosa, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos de FR) se numeran en el presente documento según Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo pero sin limitación un agente citotóxico.

Un "individuo", "sujeto" o "paciente" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo, sujeto o paciente es un ser humano.

Una proteína de fusión de IL-22 "aislada" es una que se ha separado del ambiente de una célula hospedadora que produce de forma recombinante la proteína de fusión. En algunas realizaciones, se purifica una proteína de fusión de IL-22 hasta más del 95 % o 99 % de pureza como se determina mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo intercambio iónico o HPLC de fase inversa).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

El "ácido nucleico aislado que codifica proteína de fusión de IL-22 Fc" se refiere a una o más moléculas de ácido

nucleico que codifican la proteína de fusión de IL-22 Fc, incluyendo dicha molécula o dichas moléculas de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados, dicha molécula o dichas moléculas de ácido nucleico transfectadas de forma transitoria o de forma estable en una célula hospedadora y dicha molécula o dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más localizaciones en una célula hospedadora.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen 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.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificante si se sitúa de modo que facilite la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. Se consigue unión mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o enlazadores se usan de acuerdo con la práctica convencional.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen con el mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando dichas variantes en general presentes en cantidades menores. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitación el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los loci de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos métodos y otros métodos a modo de ejemplo para preparar anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los "anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variantes. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Del extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, del extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen, sin limitación, una región Fc IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); región Fc IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes de origen natural de las mismas.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiera de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de homología con la misma, más

preferentemente al menos aproximadamente 95 % de homología con la misma. En determinadas realizaciones, la región Fc variante no está glucosilada.

La expresión "trastorno inflamatorio del intestino", "enfermedad inflamatoria del intestino" o EII se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye todas las enfermedades y afecciones patológicas cuya patogenia implica inflamación recurrente en el intestino, incluyendo intestino delgado y colon. Las EII vistas habitualmente incluyen colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. La EII no está limitada a CU y EC. Las manifestaciones de la enfermedad incluyen pero sin limitación inflamación y una reducción de la integridad epitelial en el intestino.

La expresión "enfermedad cardiovascular" o "trastorno cardiovascular" se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye todas las enfermedades y afecciones patológicas cuya patogenia implica anomalías de los vasos sanguíneos, tales como, por ejemplo, formación de placas ateroscleróticas (incluyendo placas estables o inestables/vulnerables), aterosclerosis, arterioesclerosis, arterioloesclerosis y exposición a lipopolisacárido (LPS) sistémica elevada. La expresión incluye adicionalmente enfermedades y afecciones patológicas que se benefician de la inhibición de la formación de placas ateroscleróticas. Las enfermedades cardiovasculares incluyen, sin limitación, aterosclerosis de las arterias coronarias, enfermedad microvascular coronaria, ictus, arteriopatía carotídea, arteriopatía periférica, isquemia, arteriopatía coronaria (CAD), síndrome coronario agudo (ACS), cardiopatía coronaria (CHD), afecciones asociadas con CAD y CHD, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, aneurisma, vasculitis, trombosis venosa, diabetes mellitus y nefropatía crónica por síndrome metabólico, lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, derivación cardiopulmonar. Se incluyen específicamente en este grupo todas las enfermedades cardiovasculares asociadas con la aparición, el desarrollo o cuya progresión puede controlarse por la inhibición de la formación de placas ateroscleróticas.

La expresión "afección cardiovascular" se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye todas las afecciones y enfermedades cardiovasculares cuya patología implica la formación de placas ateroscleróticas (incluyendo placas estables o inestables/vulnerables), aterosclerosis, arterioesclerosis, arterioloesclerosis y exposición a lipopolisacárido (LPS) sistémica elevada. Se incluyen específicamente en este grupo todas las afecciones y enfermedades cardiovasculares asociadas con la formación de placas ateroscleróticas, cuya aparición, desarrollo o progresión puede controlarse por la inhibición de la formación de placas ateroscleróticas. La expresión incluye específicamente enfermedades y afecciones patológicas que se benefician de la inhibición de la formación de placas ateroscleróticas. Las afecciones cardiovasculares incluyen, sin limitación, aterosclerosis de las arterias coronarias, enfermedad microvascular coronaria, ictus, arteriopatía carotídea, arteriopatía periférica, isquemia, arteriopatía coronaria (CAD), cardiopatía coronaria (CHD), afecciones asociadas con CAD y CHD, enfermedad cerebrovascular y afecciones asociadas con la enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica y afecciones asociadas con la enfermedad vascular periférica, aneurisma, vasculitis, trombosis venosa, diabetes mellitus y nefropatía crónica por síndrome metabólico, lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, y derivación cardiopulmonar. Las "afecciones asociadas con enfermedad cerebrovascular" como se usan en el presente documento incluyen, por ejemplo, ataque isquémico transitorio (TIA) e ictus. Las "afecciones asociadas con enfermedad vascular periférica" como se usan en el presente documento incluyen, por ejemplo, claudicación. Se incluyen específicamente en este grupo todas las enfermedades y afecciones cardiovasculares asociadas con la aparición, el desarrollo o cuya progresión puede controlarse por la inhibición de la formación de placas ateroscleróticas.

Puede producirse formación de placas ateroscleróticas como resultado de una respuesta inmunitaria innata a la endotoxemia metabólica, que se caracteriza por niveles elevados de lipopolisacáridos (LPS) sistémicos que se originan de la microbiota intestinal y una pérdida de integridad funcional en la barrera mucosa del intestino. La respuesta inmunitaria innata a endotoxemia da como resultado la inflamación crónica de grado bajo que es responsable de la formación de placas.

La expresión "síndrome metabólico" se usa en el presente documento en el sentido más amplio. El síndrome metabólico incluye la aparición conjunta en un sujeto adulto de varios factores de riesgo metabólicos, incluyendo al menos tres de los siguientes cinco rasgos: obesidad abdominal, que puede ser, por ejemplo, una circunferencia de cintura en hombres mayor de o igual a 90 cm y en mujeres mayor de o igual a 80 cm; triglicéridos en suero elevados, que puede ser, por ejemplo, mayor de o igual a 150 mg/dl o tratamiento farmacológico para triglicéridos elevados; nivel de colesterol HDL en suero reducido, que puede ser, por ejemplo, menor de 40 mg/dl en hombres y menor de 50 mg/dl en mujeres, o tratamiento farmacológico para colesterol HDL bajo; hipertensión, que puede ser, por ejemplo, tensión arterial sistólica mayor de 130 mmHg y tensión arterial diastólica mayor de 85 mmHg, o tratamiento farmacológico para hipertensión; y glucosa en plasma en ayunas elevada, que puede ser, por ejemplo, mayor de o igual a 100 mg/dl, tratamiento farmacológico para glucosa elevada o diabetes de tipo 2 previamente diagnosticada. Véase también Meigs, the Metabolic Syndrome (Insulin Resistance Syndrome or Syndrome X), <http://www.uptodate.com/contents/themetabolic-syndrome-insulin-resistance-syndrome-or-syndrome-x>, cuya divulgación se incorpora por la presente por referencia en el presente documento.

Para niños de más de 16 años de edad, pueden usarse los criterios anteriores para adultos. Para niños entre 10-16 años de edad, el síndrome metabólico incluye la aparición conjunta en un sujeto de varios factores de riesgo metabólicos, incluyendo al menos tres de los siguientes cinco rasgos: obesidad abdominal, que puede ser, por ejemplo, una circunferencia de cintura mayor que el percentil 90°; triglicéridos en suero elevados, que puede ser, por

ejemplo, mayor de o igual a 110 mg/dl, mayor que el percentil 95º, o tratamiento farmacológico para triglicéridos elevados; nivel de colesterol HDL en suero reducido, que puede ser, por ejemplo, menor de 40 mg/dl, menor que el percentil 5º, o tratamiento farmacológico para colesterol HDL bajo; hipertensión, que puede ser, por ejemplo, tensión arterial sistólica mayor de 130 mmHg y tensión arterial diastólica mayor de 85 mmHg, mayor que el percentil 90º, o tratamiento farmacológico para hipertensión; y glucosa en plasma en ayunas elevada, que puede ser, por ejemplo, mayor de o igual a 100 mg/dl, tolerancia alterada a la glucosa, tratamiento farmacológico para glucosa elevada o diabetes de tipo 2 previamente diagnosticada.

En general, los factores de riesgo que aparecen conjuntamente en el síndrome metabólico incluyen obesidad (tal como obesidad abdominal), hiperglucemia, dislipidemia, resistencia a la insulina y/o hipertensión. Todos estos factores de riesgo promueven el desarrollo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, diabetes o ambas. El síndrome metabólico también presenta inflamación del tejido adiposo crónica.

El síndrome metabólico puede reconocerse como un estado protrombótico, proinflamatorio, y puede asociarse con niveles elevados de uno o más de proteína sensible a C, IL-6, LPS e inhibidor del activador de plasminógeno 1; dichos marcadores pueden asociarse con un mayor riesgo de desarrollo posterior de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, diabetes o ambas.

El síndrome metabólico puede asociarse con varios trastornos relacionados con la obesidad, incluyendo uno o más de enfermedad de hígado graso con esteatosis, fibrosis y cirrosis, colangiocarcinoma hepatocelular e intrahepático, nefropatía crónica, síndrome de ovario poliquístico, respiración alterada por el sueño, incluyendo apnea del sueño obstructiva, e hiperuricemia y gota.

La expresión "trastorno relacionado con la insulina" abarca enfermedades o afecciones caracterizadas por tolerancia alterada a la glucosa. En una realización, el trastorno relacionado con la insulina es diabetes mellitus incluyendo, sin limitación, diabetes de tipo I (diabetes mellitus insulino dependiente o DMID), de tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente o DMNID), diabetes gestacional y cualquier otro trastorno que se beneficiaría por agentes que estimulen la secreción de insulina. En otra realización, el trastorno relacionado con la insulina se caracteriza por resistencia a la insulina.

El término "septicemia" se usa en su sentido más amplio y puede abarcar un estado inflamatorio sistémico provocado por infección grave. La septicemia puede estar provocada por la respuesta del sistema inmunitario a una infección grave, más habitualmente bacterias, pero también hongos, virus y parásitos en la sangre, el tracto urinario, los pulmones, la piel u otros tejidos.

La expresión "endotoxemia aguda" se usa en su sentido más amplio y puede abarcar la condición de lipopolisacárido (LPS) bacteriano en plasma aumentado. La endotoxemia aguda a su vez podría dar como resultado septicemia. El LPS aumentado en circulación sistémica inducirá inflamación crónica de grado bajo, activando la respuesta protectora endógena del hospedador a lípidos en plasma elevados que, en la condición crónica contribuye a la obesidad inducida por dieta, resistencia a la insulina y aterosclerosis, y con el tiempo acontecimientos de ECV.

Como se usa en el presente documento, el "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica con el objetivo de alterar el transcurso natural del individuo que se esté tratando y puede efectuarse tanto para profilaxis como durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, reducir la velocidad de progresión de la enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado.

Por ejemplo, con respecto a EII, el "tratamiento" puede referirse a una reducción de la probabilidad de desarrollar EII, una reducción de la velocidad de desarrollo de EII y una reducción de la gravedad de la enfermedad. Como otro ejemplo, con respecto a la formación de placas ateroscleróticas, el "tratamiento" puede referirse a una reducción de la probabilidad de desarrollar depósitos de placas ateroscleróticas, una reducción de la velocidad de desarrollo de los depósitos, una reducción del número o tamaño de los depósitos, o estabilidad de placas mejorada. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno así como aquellos en los que se pretende prevenir el trastorno. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la enfermedad, reducir la velocidad de progresión de la enfermedad, aliviar o paliar la patología y provocar remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, un polipéptido de IL-22 o proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

En determinadas realizaciones, un "sujeto que lo necesite" en el contexto de la prevención o el tratamiento de una afección cardiovascular se refiere a un sujeto al que se ha diagnosticado una enfermedad cardiovascular o afección cardiovascular (ECV) o síndrome metabólico o que muestra una o más afecciones asociadas con ECV o síndrome metabólico, un sujeto al que se ha diagnosticado o que ha mostrado una o más afecciones asociadas con ECV o

síndrome metabólico en el pasado, o un sujeto que se ha considerado en riesgo de desarrollar ECV o síndrome metabólico o una o más afecciones asociadas con ECV o síndrome metabólico en el futuro debido a factores hereditarios o ambientales. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, un sujeto que lo necesite puede ser un sujeto que muestre una ECV o síndrome metabólico o una afección asociada con una ECV o síndrome metabólico o un sujeto que ha mostrado una ECV o síndrome metabólico o una afección asociada con una ECV o síndrome metabólico en el pasado o se ha considerado en riesgo de desarrollar una ECV o síndrome metabólico o una afección asociada con una ECV o síndrome metabólico en el futuro.

En el tratamiento de una enfermedad o afección cardiovascular, un agente terapéutico puede alterar directamente la magnitud de respuesta de un componente de la respuesta inmunitaria o hacer a la enfermedad más susceptible al tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos, agentes antiinflamatorios, productos quimioterapéuticos, etc. En el tratamiento de una arteriopatía, el tratamiento podría, por ejemplo, prevenir o ralentizar la progresión de una enfermedad. Por lo tanto, el tratamiento de una arteriopatía incluye específicamente la prevención, inhibición o ralentización del desarrollo de la afección o de la progresión de un estadio de la afección a otro estadio más avanzado o a una afección relacionada, más grave.

La "patología" de una enfermedad o afección incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del sujeto. En el caso de una enfermedad o afección cardiovascular, esto incluye, sin limitación, formación de placas ateroscleróticas (incluyendo placas estables o inestables/vulnerables), aterosclerosis, arterioesclerosis, arterioloesclerosis y exposición a lipopolisacárido (LPS) sistémica elevada.

"Alivio", "aliviar" o equivalentes de los mismos, se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objetivo es aliviar, prevenir, ralentizar (reducir), disminuir o inhibir una enfermedad o afección, por ejemplo, la formación de placas ateroscleróticas. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen la enfermedad o afección así como los propensos a tener la enfermedad o afección o aquellos en los que se pretende prevenir la enfermedad o afección.

La administración "crónica" se refiere a la administración de un agente o agentes en un modo continuo a diferencia de un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado.

La administración "intermitente" es tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es más bien de naturaleza cíclica.

El término "prospecto" se usa para referirse a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, la terapia de combinación, las contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Puede conseguirse alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNAS-TAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. A efectos del presente documento, sin embargo, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha depositado, junto con la documentación para usuarios, en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde está registrado en el n.º de registro de derechos de autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un % determinado de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula de siguiente manera:

$$100 \text{ por la fracción } X/Y$$

donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como pares idénticos por el programa de alineamiento

de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará 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 de secuencia de aminoácidos de A con B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con A. A menos que se indique de otro modo específicamente, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

Como ejemplos adicionales de cálculos del % de identidad de secuencia de aminoácidos usando este método, posteriormente se demuestra cómo calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada "proteína de comparación" o "proteína de referencia" con la secuencia de aminoácidos designada "IL-22", en donde "IL-22" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-22 de interés, la "proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente a la que el polipéptido de "IL-22" de interés se compara, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes restos de aminoácidos.

Como ejemplos de cálculos del % de identidad de secuencia de aminoácidos usando este método, las tablas 1 y 2 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada "proteína de comparación" con la secuencia de aminoácidos designada "IL-22", en donde "IL-22" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-22 de interés, la "proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente a la que el polipéptido de "IL-22" de interés se compara, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes restos de aminoácidos.

|                        |                   |                             |
|------------------------|-------------------|-----------------------------|
| IL-22                  | XXXXXXXXXXXXXXXXX | (Longitud = 15 aminoácidos) |
| Proteína de referencia | XXXXXXXXYYYYYY    | (Longitud = 12 aminoácidos) |

% de identidad de secuencia de aminoácidos =  
(el número de restos de aminoácidos idénticamente coincidentes entre las dos secuencias polipeptídicas)  
dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de IL-22) =  
5 dividido por 15 = 33,3 %

|                        |                  |                             |
|------------------------|------------------|-----------------------------|
| IL-22                  | XXXXXXXXXX       | (Longitud = 10 aminoácidos) |
| Proteína de referencia | XXXXXXXXYYYYZZYZ | (Longitud = 15 aminoácidos) |

% de identidad de secuencia de aminoácidos =  
(el número de restos de aminoácidos idénticamente coincidentes entre las dos secuencias polipeptídicas)  
dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de IL-22) =  
5 dividido por 10 = 50 %

La "rigurosidad" de reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia y es en general un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración salina. En general, las sondas más largas requieren temperaturas mayores para hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende en general de la capacidad del ADN desnaturalizado para volver a hibridar cuando están presentes cadenas complementarias en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas mayores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas menores las harían menos. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen en el presente documento, pueden identificarse por las que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida 50 % (v/v) con albúmina de suero bovina 0,1 %/Ficoll 0,1 %/polivinilpirrolidona 0,1 %/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) hibridación durante una noche en una solución que emplea formamida al 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS 0,1 % y sulfato de dextrano 10 % a 42 °C, con un lavado de 10 minutos a 42 °C en SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) 0,2 x seguido de un lavado de alta rigurosidad de 10 minutos que consiste en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C.

Las "condiciones de rigurosidad moderada" pueden identificarse como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es incubación durante una noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida 20 %, SSC 5 x (NaCl 150 M, citrato de sodio 15 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, sulfato de dextrano 10 % y ADN de esperma de salmón cortado

desnaturalizado 20 mg/ml, seguido de lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-500 C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de sonda y similares.

- 5 El término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido de IL-22. "Agonista" también abarca moléculas que estimulan la transcripción o traducción de ARNm que codifica el polipéptido.

10 Las moléculas agonistas adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas; un polipéptido nativo; fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido nativo; péptidos; oligonucleótidos antisentido; moléculas orgánicas pequeñas; y ácidos nucleicos que codifican polipéptidos agonistas o anticuerpos. La referencia a "un" agonista abarca un agonista individual o una combinación de dos o más agonistas diferentes.

15 La expresión "agonista de IL-22" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica cualitativa (como se ha definido anteriormente en el presente documento) de un polipéptido de IL-22 de secuencia nativa. Los agonistas de IL-22 incluyen específicamente polipéptidos de IL-22-Fc o IL-22 Ig (inmunoadesinas), pero también moléculas pequeñas que imitan al menos una actividad biológica de IL-22. Preferentemente, la actividad biológica es unión del receptor de IL-22, que interactúa con IL-22BP, facilitando una  
20 ruta de respuesta inmunitaria innata o, en el caso de una enfermedad o afección cardiovascular, para afectar a la formación de placas ateroscleróticas, en particular para inhibir la formación de placas ateroscleróticas. La inhibición de formación de placas puede evaluarse por cualquier método de captura de imágenes adecuado conocido por los expertos habituales en la materia.

25 IL-22R1 se empareja con otras proteínas para formar heterodímeros como los receptores para determinados miembros de la familia de IL-10. Véase Quyang *et al.*, 2011, mencionado anteriormente. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los agonistas de IL-22 pueden incluir un agonista de receptor de IL-22, incluyendo una citocina (o una proteína de fusión o agonista de la misma) que se une con y desencadena señalización corriente abajo del IL-22 R1. En determinadas realizaciones, un agonista de IL-22 y un agonista de IL-22R1, incluyendo sin  
30 limitación un anticuerpo agonista de IL-22R1; un agonista de IL-20, incluyendo sin limitación polipéptido de IL-20 o proteína de fusión de IL-20 Fc; y un agonista de IL-24, incluyendo sin limitación polipéptido de IL-24 o proteína de fusión de IL-24. En otras realizaciones determinadas, los agonistas de IL-22R1 incluyen un agonista de IL-19, incluyendo sin limitación polipéptido de IL-19 o proteína de fusión de IL-19 Fc; y un agonista de IL-26, incluyendo sin limitación polipéptido de IL-26 o proteína de fusión de IL-26 Fc. Se proporcionan en el presente documento  
35 secuencias a modo de ejemplo para IL-19 (n.º de referencia de GenBank AAG16755.1 SEQ ID NO: 77), IL-20 (n.º de referencia de GenBank AAH69311.1, SEQ ID NO: 78), IL-24 (n.º de referencia de GenBank AAH09681.1, SEQ ID NO: 79) e IL-26 (n.º de referencia de GenBank NP\_060872.1, SEQ ID NO: 80). En determinadas realizaciones, un polipéptido de IL-19 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 o la proteína madura sin el péptido señal. En otras realizaciones determinadas, un polipéptido de IL-20 comprende la secuencia de aminoácidos  
40 de la SEQ ID NO: 78 o la proteína madura sin el péptido señal. En otras realizaciones más, un polipéptido de IL-24 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79 o la proteína madura sin el péptido señal. En otras realizaciones determinadas, un polipéptido de IL-26 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 o la proteína madura sin el péptido señal.

- 45 En el presente documento se define que una "molécula pequeña" tiene un peso molecular menor de aproximadamente 600, preferentemente menor de aproximadamente 1000 dalton.

Un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido de IL-22.

50 La expresión "formulación farmacéutica" o "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la formulación.

55 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinta de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, diluyente, estabilizante o conservante.

60 La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo con antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen en general estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un único dominio VH  
65 o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, pueden aislarse anticuerpos que se unen con un antígeno particular usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une con el antígeno para

explorar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico con el que se une. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicativo así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos con los que se unen de forma operativa. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

## II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en composiciones que comprenden productos terapéuticos que alivian enfermedades o trastornos asociados con IL-22 aumentando las actividades o señalización de IL-22. En determinadas realizaciones, se proporcionan polipéptido de IL-22 y proteínas de fusión de IL-22 Fc que se unen con y activan el receptor de IL-22. Las proteínas de fusión de IL-22 Fc de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades asociadas con IL-22 tales como enfermedad inflamatoria del intestino y aceleración de la curación de heridas. Además, también se proporcionan polipéptido de IL-22 y proteínas de fusión de IL-22 Fc para el tratamiento de otras enfermedades asociadas con IL-22 por ejemplo afecciones cardiovasculares, síndrome metabólico y aceleración de la curación de heridas diabéticas.

### A. Polipéptido de IL-22 ilustrativo

El polipéptido de IL-22 como se usa en el presente documento incluye un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 71 (IL-22 humana con la secuencia líder de IL-22 endógena) (véase Figura 31), o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 71. En determinadas realizaciones, el polipéptido de IL-22 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4 (IL-22 humana sin una secuencia líder) o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia. En determinadas realizaciones, el polipéptido de IL-22 comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4. En determinadas realizaciones, el polipéptido de IL-22 no comprende una fusión de Fc.

La preparación de moléculas de IL-22 nativas, junto con sus secuencias de ácido nucleico y polipeptídicas, puede realizarse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden producirse polipéptidos de IL-22 cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de IL-22. Se contempla, por supuesto, que pueden emplearse métodos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar IL-22. Por ejemplo, la secuencia de IL-22, o partes de la misma, puede producirse por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, 1969, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85:2149-2154). Puede realizarse síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o mediante automatización. Puede realizarse síntesis automática, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, Calif.) usando instrucciones del fabricante. Diversas partes de IL-22 pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir la IL-22 de longitud completa.

Pueden prepararse variantes de IL-22 introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica un polipéptido de IL-22 de secuencia nativa o mediante síntesis del polipéptido de IL-22 deseado. Los expertos en la materia apreciarán que cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos postraduccionales de IL-22, tal como cambiar el número o la posición de sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje a membrana.

Pueden realizarse variaciones en los polipéptidos de IL-22 de secuencia nativa descritos en el presente documento, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, supresión o inserción de uno o más codones que codifican una IL-22 de secuencia nativa o variante que da como resultado un cambio en su secuencia de aminoácidos en comparación con una IL-22 de secuencia nativa o variante correspondiente. Opcionalmente, la variación es por sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de un polipéptido de IL-22 de secuencia nativa. La orientación para determinar qué resto de aminoácido puede insertarse, sustituirse o suprimirse sin afectar de forma adversa a la actividad deseada puede encontrarse comparando la secuencia de IL-22 con la de moléculas proteica conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencias de aminoácidos realizados en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como el reemplazo de una leucina con una serina, es decir, reemplazos de aminoácidos conservativos. Las inserciones o supresiones pueden estar opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando de forma sistemática inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y ensayando las variantes resultantes con respecto a actividad en el ensayo *in vitro* descrito en los ejemplos posteriores.

En realizaciones particulares, se muestran sustituciones conservativas de interés en la tabla 1 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad

biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones a modo de ejemplo en la tabla 1 o como se describen posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y los productos se exploran.

Las variaciones pueden realizarse usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis (dirigida) mediada por oligonucleótidos, exploración de alanina y mutagénesis de PCR. La mutagénesis dirigida (Carter *et al.*, 1986, Nucl. Acids Res, 13:4331; Zoller *et al.*, 1987, Nucl. Acids Res., 10:6487), mutagénesis en casete (Wells *et al.*, 1985, Gene, 34:315), mutagénesis de selección por restricción (Wells *et al.*, 1986, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415) u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN variante de IL-22.

También se proporcionan en el presente documento fragmentos de un polipéptido de IL-22 de la presente invención. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o el extremo C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, en comparación con una proteína nativa de longitud completa. Determinados fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica de un polipéptido de IL-22 de la presente invención. En consecuencia, en determinadas realizaciones, un fragmento de un polipéptido de IL-22 está biológicamente activo. En determinadas realizaciones, un fragmento de IL-22 de longitud completa carece de la secuencia de péptido señal N terminal.

Se incluyen dentro del alcance de la presente invención modificaciones covalentes de polipéptidos de IL-22 de secuencia nativa y variantes. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos diana de IL-22 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N o C terminales del polipéptido de 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, por ejemplo, para su uso en el método para purificar anticuerpos anti IL-22. Los agentes de reticulación habitualmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazo-acetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditio-bis(succinimidil-propionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

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

Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos de IL-22 incluidos en el alcance de la presente invención comprende alterar el patrón de glucosilación nativo de los polipéptidos. Se pretende que "alterar el patrón de glucosilación nativo" a efectos del presente documento signifique suprimir uno o más restos de carbohidratos hallados en IL-22 de secuencia nativa y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en la IL-22 de secuencia nativa y/o alteración de la relación y/o composición de los restos de azúcar unidos al sitio o los sitios de glucosilación.

La glucosilación de polipéptidos normalmente está ligada N o ligada a O. La glucosilación ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina también pueden estar implicadas en la glucosilación ligada a O. Puede realizarse adición de sitios de glucosilación al polipéptido de IL-22 alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la IL-22 de secuencia nativa (para sitios de glucosilación ligada a N), o la adición de una secuencia de reconocimiento para glucosilación ligada a O. La secuencia de aminoácidos de IL-22 puede alterarse opcionalmente mediante cambios en el nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido de IL-22 en bases preseleccionadas de modo que se generen codones que se traduzcan en los aminoácidos deseados.

Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidratos en el polipéptido de IL-22 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Dichos métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

Puede realizarse retirada de restos de carbohidratos presentes en un polipéptido de IL-22 química o enzimáticamente o mediante sustitución por mutación de codones que codifican restos de aminoácidos que actúan como dianas para glucosilación. Se conocen en este campo técnicas de desglucosilación química y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y en Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). Puede realizarse escisión enzimática de restos de carbohidratos en polipéptidos mediante el uso de diversas endo y exoglucosidasas como se describe en Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de IL-22 comprende unir el polipéptido de IL-22 con uno de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxiálquilenos, por ejemplo de la manera expuesta en las patentes de los Estados Unidos n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. La IL-22 de secuencia nativa y variante también puede modificarse de manera que se forme una molécula quimérica que comprenda IL-22, incluyendo fragmentos de IL-22, fusionada con otra secuencia polipeptídica o de aminoácidos heteróloga.

Dicha molécula quimérica puede comprender una fusión de IL-22 con un polipéptido marcador que proporciona un epítipo con el que puede unirse un anticuerpo antimarcador. El marcador epitópico se coloca en general en el extremo amino o carboxilo del polipéptido de IL-22. La presencia de dichas formas con epítipo marcado del polipéptido de IL-22 puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Además, el suministro del marcador epitópico permite que el polipéptido de IL-22 se purifique fácilmente mediante purificación de afinidad usando un anticuerpo antimarcador u otro tipo de matriz de afinidad que se una con el marcador epitópico. Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos marcadores y sus anticuerpos respectivos. Los ejemplos incluyen marcadores de polihistidina (poli-his) o polihistidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido marcador de HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.*, 1988, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165); el marcador de c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4 y 9E10 para el mismo (Evan *et al.*, 1985, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616); y el marcador de glucoproteína del virus del herpes simple D (gD) y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, 1990, Protein Engineering, 3(6):547-553). Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.*, 1988, BioTechnology, 6:1204-1210); el péptido epitópico KT3 (Martin *et al.*, 1992, Science, 255:192-194); un péptido epitópico de alfa-tubulina (Skinner *et al.*, 1991, J. Biol. Chem., 266:15163-15166); y el marcador peptídico de 10 proteínas del gen de T7 (Lutz-Freyermuth *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397).

La molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido de IL-22 o un fragmento del mismo con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión puede ser con la región Fc de una molécula de IgG. Estos polipéptidos de fusión son 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, y se denominan con frecuencia inmunoadhesinas. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos de IL-22 o una variante de la misma, y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es normalmente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA (incluyendo IgA1 e IgA2), IgE, IgD o IgM. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 Fc muestra actividades efectoras modificadas.

El polipéptido de IL-22, o un fragmento del mismo, puede fusionarse, por ejemplo, con una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina para producir una proteína de fusión de IL-22-Ig (por ejemplo, proteína de fusión de IL-22 Fc). El polipéptido de IL-22 puede ser IL-22 humano o murino. La secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina puede ser una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana o murina.

## B. Proteína de fusión de IL-22 Fc ilustrativa

En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 aislada como se define en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones, la proteína de fusión de IL-22 se une con e induce actividad del receptor de IL-22 o señalización y/o es un agonista de actividad de receptor de IL-22.

Una proteína de fusión de IL-22 Fc descrita en el presente documento comprende un polipéptido que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En otros casos, la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende un polipéptido que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia y contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o supresiones en relación con la secuencia de referencia, pero una proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse con un receptor de IL-22. En determinados casos, se han sustituido, insertado y/o suprimido un total de 1 a 10 aminoácidos en las SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 24 o 26. En determinados casos, se producen sustituciones, inserciones o supresiones en regiones fuera de la IL22 (es decir, en el Fc). En determinados casos particulares, el resto de Lys C terminal de Fc está suprimido. En otros casos determinados, los restos de Gly y Lys C terminales de Fc están ambos suprimidos.

En determinadas realizaciones, se proporcionan proteínas de fusión de IL-22 Fc que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Se muestran sustituciones conservativas en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones a modo de ejemplo", y como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de cadenas laterales de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en la proteína de fusión de IL-22 Fc y explorarse los productos con respecto a una actividad deseada, por ejemplo, unión a receptor de IL-22 conservada/mejorada,

inmunogenicidad reducida o señalización de receptor de IL-22 mejorada.

**TABLA 1**

| Resto original | Sustituciones a modo de ejemplo     | Sustituciones preferidas |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Ala (A)        | Val; Leu; Ile                       | Val                      |
| Arg (R)        | Lys; Gln; Asn                       | Lys                      |
| Asn (N)        | Gln; His; Asp, Lys; Arg             | Gln                      |
| Asp (D)        | Glu; Asn                            | Glu                      |
| Cys (C)        | Ser; Ala                            | Ser                      |
| Gln (Q)        | Asn; Glu                            | Asn                      |
| Glu (E)        | Asp; Gln                            | Asp                      |
| Gly (G)        | Ala                                 | Ala                      |
| His (H)        | Asn; Gln; Lys; Arg                  | Arg                      |
| Ile (I)        | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina | Leu                      |
| Leu (L)        | Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile                      |
| Lys (K)        | Arg; Gln; Asn                       | Arg                      |
| Met (M)        | Leu; Phe; Ile                       | Leu                      |
| Phe (F)        | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr        | Tyr                      |
| Pro (P)        | Ala                                 | Ala                      |
| Ser (S)        | Thr                                 | Thr                      |
| Thr (T)        | Val; Ser                            | Ser                      |
| Trp (W)        | Tyr; Phe                            | Tyr                      |
| Tyr (Y)        | Trp; Phe; Thr; Ser                  | Phe                      |
| Val (V)        | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina | Leu                      |

5 Los aminoácidos pueden agruparse según propiedades de cadenas laterales comunes:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

15 Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un método útil para la identificación de restos o regiones de una proteína que pueden ser diana de mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar la interacción de la proteína con su compañero de unión. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o adicionalmente, puede usarse una estructura cristalina de un complejo proteico (por ejemplo, un complejo de citocina-receptor) para identificar puntos de contacto entre una proteína y su compañero de unión. Dichos restos de contacto y restos adyacentes pueden ser diana o eliminarse como candidatos para sustitución. Las variantes pueden explorarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en su longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples.

#### 30 **a) Variantes de glucosilación**

Una proteína de fusión de Fc proporcionada en el presente documento puede alterarse para aumentar o reducir la medida en que la proteína de fusión, especialmente la parte de Fc de la proteína de fusión, está glucosilada. La adición o supresión de sitios de glucosilación a una proteína puede realizarse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o se retiren uno o más sitios de glucosilación.

Cuando la proteína de fusión comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido ramificado, biantenarico, que se une en general por un enlace N con Asn<sup>297</sup> del dominio CH<sub>2</sub> de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. Pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo o la región Fc de un anticuerpo para crear variantes de Fc con determinadas propiedades mejoradas.

La cantidad de fucosa unida al dominio CH2 de la región Fc puede determinarse calculando la cantidad promedio de fucosa en la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 o N297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y altas en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina localizado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración de EU de restos de región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, publicaciones de patentes de los Estados Unidos n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); solicitud de patente de los Estados Unidos US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con genes desactivados, tales como células CHO con el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, desactivado (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y documento WO2003/085107).

Se describen además variantes de anticuerpos con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarío unido a la región Fc del anticuerpo se bisecciona por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente de los Estados Unidos n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

#### **b) Variantes de regiones Fc**

En determinadas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de una proteína de fusión de Fc proporcionada en el presente documento, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de Fc que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que la hacen un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo o una proteína de fusión que comprende una región Fc *in vivo* es importante pero determinadas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo o Fc carezca de unión a FcγR (y por lo tanto que probablemente carezca de actividad ADCC), pero conserve la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la patente de los Estados Unidos n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I. *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo para citometría de flujo ACTI™ (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo o Fc es incapaz de unirse con C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de la unión a FcRn y eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen los que tienen sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los Estados Unidos n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (patente de los Estados Unidos n.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpos o Fc con unión mejorada o disminuida con FcR. (Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 6.737.056; documento WO 2004/056312 y Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).)

En determinadas realizaciones, una proteína de fusión de IL-22 Fc comprende una variante de Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la ADCC, por ejemplo, sustitución en la posición 297 de la región Fc para retirar el sitio de N-glucosilación y conservar aún la actividad de unión a FcRn (numeración de restos de EU).

En algunas realizaciones, se realizan alteraciones en la región Fc que dan como resultado disminución de la unión con C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.194.551, documento WO 99/51642 y Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada con el receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)), en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc con FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más de los restos de región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del resto de región Fc 434 (patente de los Estados Unidos n.º 7.371.826).

Véase también Duncan y Winter, Nature 322:738-40 (1988); patente de los Estados Unidos N.º 5.648.260; patente de los Estados Unidos N.º 5.624.821; y documento WO 94/29351 que se refiere a otros ejemplos de variantes de región Fc.

### **c) Variantes modificadas técnicamente con cisteína**

Puede ser deseable crear una proteína de fusión de Fc modificada técnicamente con cisteína, en la que uno o más restos de la región Fc de un anticuerpo se sustituyen con restos de cisteína. Los restos de cisteína sustituidos pueden aparecer en sitios accesibles del Fc. Sustituyendo esos restos con cisteína, se sitúan de este modo grupos tiol reactivos en sitios accesibles del Fc y pueden usarse para conjugar el Fc con otros restos, tales como restos farmacológicos o restos de enlazador-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, S400 (numeración de EU) de la región Fc de cadena pesada puede sustituirse con cisteína. Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N.º 7.521.541.

### **C. Métodos recombinantes y composiciones**

Los polipéptidos de IL-22 pueden prepararse por métodos recombinantes rutinarios, por ejemplo, cultivar células transformadas o transfectadas con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-22, un fragmento o variante del mismo o una proteína de fusión que lo contenga. También se proporcionan células hospedadoras que comprenden cualquiera de dichos vectores. Como ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, *E. coli* o levadura. Se proporciona además un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento y comprende cultivar células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para la producción de polipéptidos de IL-22 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseada. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto en la materia sin excesiva experimentación. En general, pueden encontrarse principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

Los expertos habituales en la materia conocen métodos de transfección, por ejemplo, mediante CaPO<sub>4</sub> y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, o electroporación se usa en general para procaricidas u otras células que contengan barreras de pared celular considerables. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para transformación de determinadas células vegetales, como se describe en Shaw *et al.*, Gene, 23:315 (1983).

y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin dichas paredes celulares, puede emplearse el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de transformación de sistemas hospedadores de células de mamífero en la patente de los Estados Unidos n.º 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo normalmente según el método 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 pueden usarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero, véase Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Pueden recuperarse polipéptidos expresados de forma recombinante de la presente invención de medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de Sepharose de proteína A para retirar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes metálicas para unirse con formas marcadas con epítopos de un polipéptido de la presente invención. Pueden emplearse diversos 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 las etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y el polipéptido particular producido.

Pueden emplearse métodos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia que codifica un polipéptido o parte del mismo, puede producirse por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart et al., 1969, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, J. 1963, *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). Puede realizarse síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o mediante automatización. Puede realizarse síntesis automática, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando instrucciones del fabricante. Diversas partes de un polipéptido de la presente invención o parte del mismo pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido de longitud completa o parte del mismo.

En otras realizaciones, la invención proporciona moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionado con una secuencia polipeptídica o de aminoácidos heteróloga. Los ejemplos de dichas moléculas quiméricas incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionados con una secuencia de marcador epitópico o una región Fc de una inmunoglobulina.

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen pero sin limitación eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *E. coli*. Están públicamente disponibles diversas cepas de *E. coli*, tales como cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635).

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican IL-22. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior usado habitualmente.

Se obtienen células hospedadoras adecuadas para la expresión de IL-22 glucosilada de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*, así como células vegetales. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Más ejemplos específicos incluyen células CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de 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 células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula hospedadora apropiada está dentro de la experiencia de la técnica.

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica IL-22 puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Están públicamente disponibles diversos vectores. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, un cósmido, una partícula vírica o un fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector por diversos procedimientos. En general, se inserta ADN en un sitio o sitios de endonucleasas de restricción apropiados usando técnicas conocidas en este campo. Los componentes de vector incluyen en general, pero sin limitación, uno o más de una secuencia 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 emplea técnicas de ligamiento convencionales que son conocidas por los expertos en la materia.

Los polipéptidos de IL-22 pueden producirse de forma recombinantes no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduro, así como una proteína de fusión de IL-22 Fc. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de IL-22 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, 1 pp, o líderes de la enterotoxina termoestable II. Para secreción de levadura la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, líder del factor alfa (incluyendo líderes del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.010.182), o líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, pueden usarse secuencias señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o una relacionada, así como líderes secretores víricos.

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias se conocen bien para diversas bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 $\mu$  es adecuado para levadura, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

Los vectores de expresión y clonación contendrán normalmente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero es uno que permite la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de IL-22, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe en Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [véase, por ejemplo, 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 que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N.º 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

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

Los ejemplos de secuencias de promotores adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [véase, por ejemplo, Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem, 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [véase, por ejemplo, Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglicosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Se describen además vectores y promotores adecuados para su uso en expresión de levadura en el documento EP 73.657.

La transcripción de IL-22 de vectores en células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de

mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Puede aumentarse la transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos de IL-22 por eucariotas superiores insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de acción en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de IL-22, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levadura, hongos, insecto, planta, animal, ser humano o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica IL-22.

Se describen otros métodos, vectores y células hospedadoras adicionales adecuados para adaptación a la síntesis de IL-22 en cultivo de células de vertebrados recombinantes en Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:4046 (1979); EP 117.060; y documento EP 117.058.

La amplificación y/o expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [véase, por ejemplo, Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación in situ, usando una sonda marcada de forma apropiada, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN y dobles cadenas híbridas de ADN-ARN o dobles cadenas de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y el ensayo puede llevarse a cabo cuando la doble cadena esté unida a una superficie, de modo que tras la formación de doble cadena en la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido a la doble cadena.

La expresión génica, como alternativa, puede medirse mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestras pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido de IL-22 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o contra una secuencia exógena fusionada con ADN de IL-22 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

Pueden recuperarse formas de IL-22 de medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana usando una solución de detergente adecuada (por ejemplo Triton-X 100) o por escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión de IL-22 pueden alterarse por diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, ultrasonidos, rotura mecánica o agentes de lisado celular.

Puede desearse purificar IL-22 de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de Sepharose de proteína A para retirar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes metálicas para unirse con formas marcadas con epítopos del polipéptido de IL-22. Pueden emplearse diversos 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 las etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y la IL-22 particular producida. Los métodos generales anteriormente descritos también pueden aplicarse a la preparación de proteína de fusión de IL-2 Fc.

De forma similar, las proteínas de fusión de IL-22 Fc pueden producirse usando métodos recombinantes y composiciones, como se describe en, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, *et al.* 1990, Academic Press, San Diego, CA). En una realización, se proporciona ácido nucleico aislado que codifica proteínas de fusión de IL-22 Fc descritas en el presente documento. En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una

célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la proteína de fusión de IL-22 Fc. En determinadas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfóide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una

realización, se proporciona un método para preparar una proteína de fusión de IL-22 Fc, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de IL-22 Fc, como se ha proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para expresión de la proteína de fusión de Fc y opcionalmente recuperar la proteína de fusión de Fc de la célula hospedadora (o medio de cultivo de célula hospedadora).

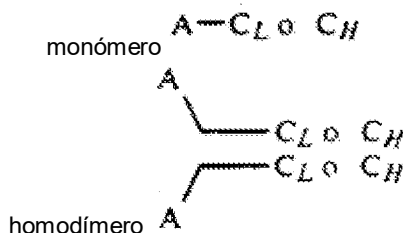
Para producción recombinante de una proteína de fusión de IL-22 Fc, ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de Fc, por ejemplo, como se describe en el presente documento, se aísla e inserta en uno o más vectores para clonación adicional y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican la proteína de fusión). En determinadas realizaciones, cuando se preparan las proteínas de fusión de IL-22 Fc, puede ligarse ácido nucleico que codifica el polipéptido de IL-22 o un fragmento del mismo a ácido nucleico que codifica una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en una localización específica en el dominio constante para dar como resultado una fusión de Fc en el extremo C de IL-22; sin embargo también son posibles fusiones N terminales.

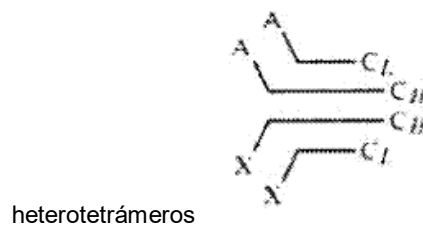
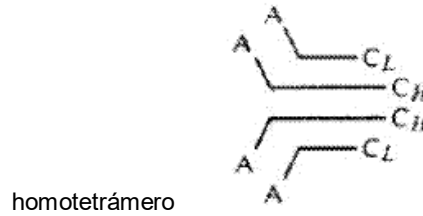
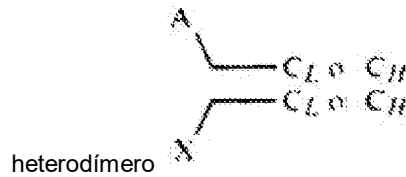
Como ejemplo para construir una proteína de fusión de IL-22 Fc, el ADN que codifica IL-22 se escinde por una enzima de restricción en o próximo al extremo 3' del ADN que codifica IL-22 y en un punto en o cerca del ADN que codifica el extremo N terminal del polipéptido maduro (donde se contempla el uso de un líder diferente) o en o próximo a la región codificante N terminal para proteína de longitud completa de IL-22 (donde se emplea una señal nativa). Este fragmento de ADN se inserta después fácilmente en ADN que codifica una región constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina y, si es necesario, se adapta por mutagénesis de supresión. Preferentemente, esta es una inmunoglobulina humana cuando se pretende usar la proteína de fusión para terapia *in vivo* para seres humanos.

Las quimeras de IL-22-inmunoglobulina pueden ensamblarse como monómeros, hetero u homomultímero, o como dímeros o tetrámeros. En general, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas como se representa por los siguientes diagramas. Una unidad estructural de cuatro cadenas básica es la forma en que existen IgG, IgD e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de mayor peso molecular; IgM existe en general como un pentámero de unidades de cuatro cadenas básicas mantenidas unidas

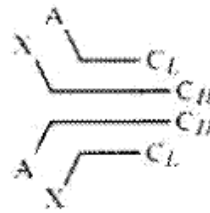
por enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente globulina IgG, también puede existir en una forma multimérica en suero. En el caso de multímeros, cada unidad de cuatro cadenas puede ser igual o diferente. Véase también Capon *et al.* patente de los Estados Unidos N.º 5.116.964, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.

En los diagramas en el presente documento, "A" significa al menos una parte de un compañero de unión (tal como IL-22) que contiene un sitio de unión que es capaz de unirse con su ligando o receptor (tal como IL-22 R); X es un agente adicional, que puede ser otro compañero de unión funcional (igual que A o diferente), un polipéptido de múltiples subunidades (cadena) como se ha definido anteriormente (por ejemplo, una integrina), una parte de un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina tal como una región variable o un dominio de tipo región variable, incluyendo una región variable de inmunoglobulina nativa o quimérica, una toxina tal como exotoxina de *Pseudomonas* o ricina, o un agente terapéutico polipeptídico no asociado normalmente de otro modo con un dominio constante; y V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H</sub> representan dominios variables o constantes de cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina. Se entiende que estos diagramas son únicamente a modo de ejemplo de estructuras de inmunoglobulina ensambladas generales, y no abarcan todas las posibilidades. Se entenderá, por ejemplo, que podría haber convenientemente varias "A" o "X" diferentes en cualquiera de estas construcciones.



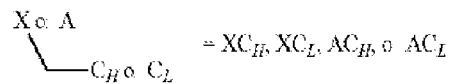


y

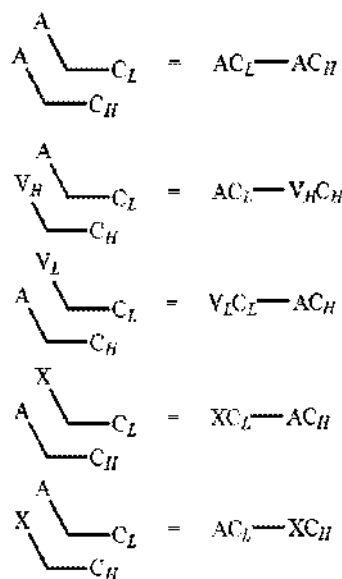


5

- 10 Se entenderá que estos diagramas son únicamente ilustrativos, y que se cree que las cadenas de los multímeros están unidas por enlaces disulfuro de la misma manera que inmunoglobulinas nativas. Se secretan fácilmente inmunoglobulinas híbridas de células de mamífero transformadas con el ácido nucleico apropiado. Las formas secretadas incluyen aquellas en las que el epítipo compañero de unión está presente en dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera y heterotetrámeros de cadena pesada y ligera en los que el epítipo compañero de unión está presente fusionado con una o más cadenas ligeras o pesadas, incluyendo heterotetrámeros en los que se sustituyen hasta e incluyendo los cuatro análogos de región variable. Cuando está presente un dominio de tipo variable no compañero de unión de cadena ligera-pesada, se proporciona por lo tanto un anticuerpo heterofuncional.
- 15
- 20 Pueden utilizarse cadenas o unidades básicas de estructura variante para ensamblar los monómeros y hetero y homomultímeros e inmunoglobulinas de la presente invención. Se representan en diagrama posteriormente ejemplos específicos de estas unidades básicas y se indican sus equivalentes (para fines de las fórmulas atenuadas posteriores).



25



Se presentan en diagramas esquemáticos posteriormente diversas inmunoglobulinas nuevas ensambladas a modo de ejemplo producidas. Además de los símbolos definidos anteriormente, n es un número entero e Y designa un resto de reticulación covalente.

5

- (a)  $AC_L$ ;  
 (b)  $AC_L-AC_H$ ;  
 (c)  $AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, V_L C_L-V_H C_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_H C_H, XC_H-V_L C_L, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;  
 (d)  $AC_L-AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, V_L C_L-V_H C_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_H C_H, XC_H-V_L C_L, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;  
 (e)  $AC_L-V_H C_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, V_L C_L-V_H C_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_H C_H, XC_H-V_L C_L, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;  
 (f)  $V_L C_L-AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, V_L C_L-V_H C_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_H C_H, XC_H-V_L C_L, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;  
 (g)  $[A-Y]_n-[V_L C_L-V_H C_H]_2$ ;  
 (h)  $XC_H \text{ o } XC_L-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;  
 (i)  $XC_L-XC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;  
 (j)  $XC_L-V_H C_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]_2$ ;  
 (k)  $XC_H-V_L C_L-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;  
 (l)  $XC_L-AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, V_L C_L-V_H C_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_H C_H, XC_H-V_L C_L, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;  
 (m)  $AC_L-XC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, V_L C_L-V_H C_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_H C_H, XC_H-V_L C_L, XC_L-AC_H, \text{ o } AC_L-XC_H]$ ;

A, X, V o C pueden modificarse con un resto de entrecruzamiento covalente (Y) para ser  $(A-Y)_n$ ,  $(X-Y)_n$  etc.

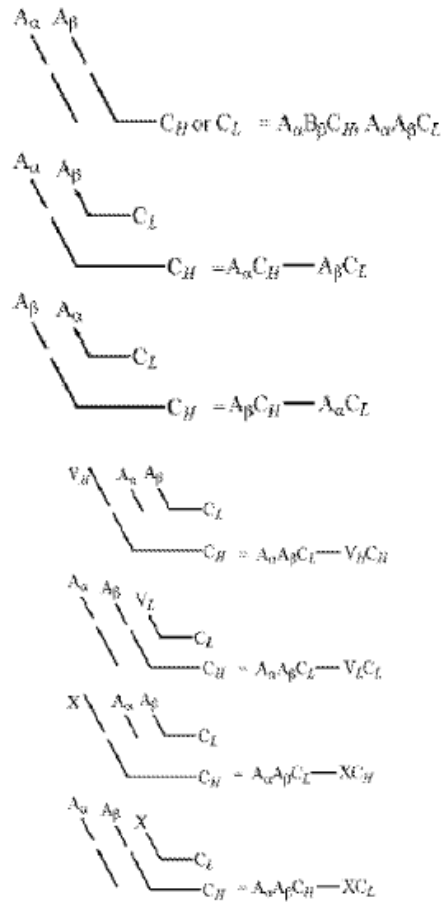
10

El compañero de unión A (tal como IL-22) también puede ser una molécula multicatenaria, por ejemplo que tiene cadenas indicadas arbitrariamente como  $A_\alpha$  y  $A_\beta$ . Estas cadenas como una unidad se localizan en los sitios indicados para la cadena individual "A" anterior. Una de las múltiples cadenas se fusiona con una cadena de inmunoglobulina (con las cadenas restantes asociadas de forma covalente o no covalente con la cadena fusionada de la manera normal) o, cuando el compañero de unión de ligando contiene dos cadenas, una cadena se fusiona por separado con una cadena ligera de inmunoglobulina y la otra cadena con una cadena pesada de inmunoglobulina.

15

Las unidades básicas que tienen las estructuras como se representa en diagrama posteriormente son ejemplos de las usadas para crear monómero y hetero y homomultímeros, particularmente dímeros y trímeros con compañeros

de unión a ligando multicatenarios:



- 5 Diversos anticuerpos ensamblados novedosos a modo de ejemplo que tienen un compañero de unión a ligando bicatenario ("A $_{\alpha}$  y A $_{\beta}$ ") utilizados en estructuras unitarias como anteriormente se representan en diagramas esquemáticos posteriormente.

- (n)  $A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow [AC_H, AC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow V_HC_H, V_LC_L \rightarrow AC_H, V_LC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L \rightarrow XC_H, XC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H \rightarrow V_LC_L, XC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow XC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L, A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H, A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H, \text{ or } A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow XC_L]$ .
- (o)  $A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow [AC_H, AC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow V_HC_H, V_LC_L \rightarrow AC_H, V_LC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L \rightarrow XC_H, XC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H \rightarrow V_LC_L, XC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow XC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L, A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H, A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H, \text{ or } A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow XC_L]$ .
- (p)  $A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H \rightarrow [AC_H, AC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow V_HC_H, V_LC_L \rightarrow AC_H, V_LC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L \rightarrow XC_H, XC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H \rightarrow V_LC_L, XC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow XC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L, A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H, A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H, \text{ or } A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow XC_L]$ .
- (q)  $A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H \rightarrow [AC_H, AC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow V_HC_H, V_LC_L \rightarrow AC_H, V_LC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L \rightarrow XC_H, XC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H \rightarrow V_LC_L, XC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow XC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L, A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H, A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H, \text{ or } A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow XC_L]$ .
- (r)  $A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H \rightarrow [AC_H, AC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow V_HC_H, V_LC_L \rightarrow AC_H, V_LC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L \rightarrow XC_H, XC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H \rightarrow V_LC_L, XC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow XC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L, A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H, A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H, \text{ or } A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow XC_L]$ .
- (s)  $A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L \rightarrow [AC_H, AC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow V_HC_H, V_LC_L \rightarrow AC_H, V_LC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L \rightarrow XC_H, XC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H \rightarrow V_LC_L, XC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow XC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L, A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H, A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H, \text{ or } A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow XC_L]$ .
- (t)  $A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H \rightarrow [AC_H, AC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow V_HC_H, V_LC_L \rightarrow AC_H, V_LC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L \rightarrow XC_H, XC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H \rightarrow V_LC_L, XC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow XC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L, A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H, A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H, \text{ or } A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow XC_L]$ .
- (u)  $A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow [AC_H, AC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow V_HC_H, V_LC_L \rightarrow AC_H, V_LC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L \rightarrow XC_H, XC_L \rightarrow V_HC_H, XC_H \rightarrow V_LC_L, XC_L \rightarrow AC_H, AC_L \rightarrow XC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L, A_{\alpha}C_L \rightarrow A_{\beta}C_H, A_{\beta}C_L \rightarrow A_{\alpha}C_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow V_HC_H, A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow V_LC_L, A_{\alpha}A_{\beta}C_L \rightarrow XC_H, \text{ or } A_{\alpha}A_{\beta}C_H \rightarrow XC_L]$ .

Las estructuras mostradas en las tablas anteriores muestran solamente elementos clave, por ejemplo no muestran dominios de unión (J) u otros de las inmunoglobulinas, ni se muestran enlaces disulfuro. Estos se omiten para mayor brevedad. Sin embargo, cuando dichos dominios sean necesarios para actividad de unión se construirán presentes en las localizaciones ordinarias que ocupan en las moléculas compañeras de unión o de inmunoglobulina según sea el caso.

Se conoce ADN que codifica regiones constantes de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina o está fácilmente disponible de bibliotecas de ADNc o se sintetiza. Véase, por ejemplo, Adams *et al.*, Biochemistry 19:2711-2719 (1980); Gough *et al.*, Biochemistry 19:2702-2710 (1980); Dolby *et al.*, P.N.A.S. USA, 77:6027-6031 (1980); Rice *et al.*, P.N.A.S. USA 79:7862-7865 (1982); Falkner *et al.*, Nature 298:286-288 (1982); y Morrison *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 2:239-256 (1984). Se proporciona en el presente documento una secuencia de ADN que codifica IL-22 humana con la secuencia líder endógena (SEQ ID NO: 70). Las secuencias de ADN que codifican otros compañeros de unión deseados que se conocen o están fácilmente disponibles de bibliotecas de ADNc son adecuadas en la práctica de la presente invención.

El ADN que codifica una proteína de fusión de IL-22 Fc de la presente invención se transfecta a una célula hospedadora para expresión. Si se desean multímeros entonces la célula hospedadora se transforma con ADN que codifica cada cadena que compondrá el multímero, seleccionándose la célula hospedadora de forma óptima para ser capaz de ensamblar las cadenas de los multímeros de la manera deseada. Si la célula hospedadora produce una inmunoglobulina antes de la transfección entonces es necesario transfectar solamente con el compañero de unión fusionado con cadena ligera o pesada para producir un heteroanticuerpo. Las inmunoglobulinas anteriormente mencionadas que tienen una o más ramas que portan el dominio compañero de unión y una o más ramas que portan regiones variables adjuntas dan como resultado especificidad doble para el ligando compañero de unión y para un antígeno o resto terapéutico. Se usan células cotransformadas de forma múltiple con los métodos recombinantes anteriormente descritos para producir polipéptidos que tienen múltiples especificidades tales como las inmunoglobulinas heterotetraméricas analizadas anteriormente.

Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no es necesaria en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina podría estar presente asociada de forma covalente con un polipéptido de fusión de IL-22-cadena pesada de inmunoglobulina. En este caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se coexpresa normalmente con el ADN que codifica la proteína de fusión de IL-22-cadena pesada de inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asociarán de forma covalente para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina con enlaces disulfuro. Se desvelan métodos adecuados para la preparación de dichas estructuras, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567 expedida el 28 de marzo de

1989. Las células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión de vectores codificantes de proteínas diana incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, puede producirse proteína de fusión de IL-22 en bacterias, en particular cuando la glucosilación y la función efectora de Fc no son necesarias o son perjudiciales. Para expresión de polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, la proteína de fusión de Fc puede aislarse de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente. Como se ejemplifica en la sección de ejemplos, los métodos de purificación adicionales incluyen sin limitación purificación usando una columna de proteína A.

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados, incluyendo hongos y cepas de levadura cuyas rutas de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

También se obtienen células hospedadoras adecuadas para la expresión de proteínas glucosiladas de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden usarse junto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden usarse células de vertebrados como hospedadores. Por ejemplo, las líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describen, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describen, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR<sup>-</sup> (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

#### D. Agonistas de IL-22

También se describen en el presente documento agonistas de IL-22 para realizaciones de métodos. Los agonistas de IL-22 tienen actividad biológica de IL-22 como se define en el presente documento. El agonista de IL-22 puede ser un anticuerpo. Un anticuerpo anti IL-22 puede ser un anticuerpo agonista que promueve la interacción de IL-22 con IL-22R. En un caso particular, un agonista de IL-22 es un anticuerpo que se une con IL-22BP y bloquea o inhibe la unión de IL-22BP con IL-22 y de este modo induce o aumenta una actividad de IL-22 (por ejemplo, unión con IL-22R). En otro caso, un agonista de IL-22 es un oligopéptido que se une con IL-22. Los oligopéptidos pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos son habitualmente de al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud. Dichos oligopéptidos pueden identificarse sin excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que se conocen bien en este campo técnicas para explorar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente con una diana polipeptídica (véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; publicaciones de PCT n.º WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:178-182 (1985); Geysen et al., en *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274 (1987); Schoofs et al., *J. Immunol.*, 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363 y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668).

Un agonista de IL-22 puede ser una molécula orgánica que se une con IL-22, distinta de un oligopéptido o anticuerpo como se describe en el presente documento. Una molécula orgánica puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña. Una molécula orgánica que se une con IL-22 puede identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véase, por ejemplo, publicaciones de PCT n.º WO00/00823 y WO00/39585). Dichas moléculas orgánicas son habitualmente de menos de aproximadamente 2000 dalton de tamaño, como alternativa menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 dalton de tamaño, en donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse con IL-22 como se describe en el presente documento pueden identificarse sin excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que se conocen bien en este campo técnicas para explorar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse con una diana polipeptídica (véase, por ejemplo, publicaciones de PCT n.º WO00/00823 y WO00/39585). En particular, un agonista de IL-22 puede ser una molécula orgánica que se une con IL-22BP y bloquea o inhibe la unión de IL-22BP con IL-22 y de este modo induce o aumenta una actividad de IL-22 (por ejemplo, unión con IL-22R). En otro caso más, se proporcionan agonistas de IL-22. Los agonistas a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, IL-22 nativa o IL-22R; fragmentos, variantes o formas modificadas de IL-22 o IL-22R que conservan al menos una actividad del polipéptido nativo; agentes que son capaces de unirse con y activar IL-22R; y agentes que inducen la sobreexpresión de IL-22 o IL-22R o ácidos nucleicos que codifican IL-22 o IL-22R.

## E. Ensayos

La proteína de fusión de IL-22 Fc proporcionada en el presente documento puede identificarse, explorarse o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

### 1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención se ensaya con respecto a su actividad de unión a receptor, por ejemplo, por métodos conocidos tales como ELISA, análisis de transferencia de western, unión a superficie celular por Scatchard, resonancia de plasmón superficial. En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con la proteína de fusión de IL-22 Fc por la unión con el receptor de IL-22. En un aspecto adicional, puede usarse una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención para detectar la presencia o cantidad de receptor de IL-22 o proteína de unión a IL-22 (receptor soluble) presente en una muestra biológica. En un aspecto adicional, puede usarse una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención para detectar la presencia o cantidad de receptor de IL-22 presente en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, la muestra biológica se bloquea en primer lugar con un anticuerpo de control de isotipo no específico para saturar cualquier receptor de Fc en la muestra.

### 2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar la actividad biológica de la proteína de fusión de IL-22 Fc. La actividad biológica de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc puede incluir, por ejemplo, unión con el receptor de IL-22, estimulación de la señalización de IL-22 e inducción de la expresión de STAT3, RegIII y/o PancrePAP. Además, en el caso de una enfermedad o afección cardiovascular, la actividad biológica puede incluir afectar a la formación de placas ateroscleróticas, en particular para inhibir la formación de placas ateroscleróticas. La inhibición de formación de placas puede evaluarse por cualquier método de captura de imágenes adecuado conocido por los expertos habituales en la materia.

## F. Conjugados

La invención también proporciona conjugados que comprenden una proteína de fusión de IL-22 Fc descrita en el presente documento conjugada con uno o más agentes para detección, formulación, prolongación de la semivida, mitigación de la inmunogenicidad o penetración tisular. La conjugación a modo de ejemplo incluye sin limitación PEGilación y unión con isótopos radiactivos.

En otra realización, un conjugado comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc como se describe en el presente documento conjugada con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Está disponible diversos isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radiconjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo tc99m o I123, o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

## G. Métodos y composiciones para detección

Cualquiera de las fusiones de IL-22 Fc proporcionadas en el presente documento puede ser útil para detectar la presencia del receptor de IL-22 en una muestra biológica. En determinados casos, el método comprende además la

etapa de bloquear cualquier receptor de Fc en la muestra con un anticuerpo de control de isotipo no específico. El término "detectar" como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados casos, una muestra biológica comprende una célula o un tejido, tal como tejidos epiteliales.

En un caso se proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en un método de detección. En un ejemplo adicional, se proporciona un método para detectar la presencia del receptor de IL-22 en una muestra biológica. En determinados ejemplos, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con una proteína de fusión de IL-22 Fc como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión de la proteína de fusión de IL-22 Fc con el receptor de IL-22, y detectar si se forma un complejo entre la proteína de fusión de IL-22 Fc y el receptor de IL-22. En determinados, el método comprende además la etapa de bloquear cualquier receptor de Fc en la muestra con un anticuerpo de control de isotipo no específico. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En un ejemplo, una proteína de fusión de IL-22 Fc se usa para seleccionar sujetos elegibles para terapia con proteína de fusión de IL-22 Fc, por ejemplo donde el receptor de IL-22 es un biomarcador para selección de pacientes.

En determinados ejemplos, se proporcionan proteínas de fusión de IL-22 Fc marcadas. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrón-densos, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelados de tierras raras o fluoreceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de los Estados Unidos N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacinedionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

#### H. Formulaciones farmacéuticas

Las composiciones basadas en IL-22 (que incluyen proteína de fusión de IL-22 Fc) en el presente documento se formularán, dosificarán y administrarán de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la condición clínica del sujeto individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. En una realización, la composición puede usarse para aumentar la duración de la supervivencia de un sujeto humano susceptible de o al que se ha diagnosticado la enfermedad o afección. La duración de la supervivencia se define como el tiempo desde la primera administración del fármaco hasta la muerte.

Las formulaciones farmacéuticas se preparan usando métodos convencionales conocidos en la técnica mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) y Remington's Pharmaceutical Sciences 20ª edición, ed. A. F. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams y Wilkins, Filadelfia, Pa), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables no son en general tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitación: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo en el presente documento incluyen agentes de dispersión farmacológica intersticial tales como glucoproteínas de hialuronidasa activas neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP a modo de ejemplo y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patentes de los Estados Unidos 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Opcionalmente, pero preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente cloruro de sodio, y preferentemente a concentraciones aproximadamente fisiológicas.

Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones la concentración conservante varía de 0,1 % a 2,0 %, normalmente v/v. Los conservantes adecuados incluyen los conocidos en las técnicas farmacéuticas. Alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno, cloruro de benzalconio y propilparabeno son conservantes preferidos. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración de 0,005 a 0,02 %.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Se describen formulaciones liofilizadas a modo de ejemplo en la patente de los Estados Unidos n.º 6.267.958. Las formulaciones acuosas incluyen las descritas en la patente de los Estados Unidos n.º 6.171.586 y el documento WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un esteroide, antagonista de TNF u otros productos terapéuticos antiinflamatorios. Dichos principios activos están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos pueden estar inmovilizados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína de fusión de IL-22 Fc, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de los Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como acetato de etilvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular mediante intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Una composición farmacéutica para administración tópica puede formularse, por ejemplo, en forma de un gel tópico. Véase, por ejemplo, documentos US 4.717.717, US 5.130.298, US 5.427.778, US 5.457.093, US 5.705.485, US 6.331.309 y WO2006/138.468. En determinadas realizaciones, la composición puede formularse en presencia de derivados de celulosa. En otras realizaciones determinadas, la formulación tópica puede reconstituirse a partir de formulación liofilizada con suficiente tampón o diluyente antes de su administración. En determinadas realizaciones, el polipéptido de IL-22 o la proteína de fusión de IL-22 Fc se formula para administración tópica a un sujeto que tenga un defecto en la curación de heridas epiteliales. En determinadas realizaciones particulares, la curación de heridas epiteliales se produce en la piel. En otras realizaciones particulares determinadas, el sujeto es un ser humano que tiene un defecto en la curación de heridas. En otras realizaciones determinadas, la formulación tópica que comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención puede usarse para mejora la curación de heridas después de incisiones quirúrgicas internas o externas.

En una realización de la invención, una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en la aceleración, promoción o mejora de la curación de heridas está en una formulación de un gel tópico, por ejemplo, en una jeringa o un recipiente precargado o, como alternativa, el compuesto de la invención puede mezclarse con una matriz de gel justo antes de su administración tópica a un paciente. En determinadas realizaciones, también se administra un agente terapéutico adicional por vía tópica, bien simultánea o bien secuencialmente. También se pueden usar opcionalmente otras vías de administración, por ejemplo, administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo, pero sin limitación, administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la

administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

Normalmente para curación de heridas, se formula una proteína de fusión de IL-22 Fc para suministro específico de sitio. Cuando se aplica por vía tópica, la fusión de IL-22 Fc se combina convenientemente con otros ingredientes, tales como vehículos y/o adyuvantes. No hay limitaciones en la naturaleza de dichos otros ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables y eficaces para su administración pretendida y no pueden degradar la actividad de los principios activos de la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen pomadas, cremas, geles, pulverizaciones o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Las composiciones también pueden impregnarse en apósitos estériles, parches transdérmicos, escayolas y vendas, opcionalmente en forma líquida o semilíquida. También puede usarse matrices de celulosa regenerada oxidada/colágeno, por ejemplo, apósito de matriz PROMOGRAN o MATRIZ PROMOGRAN PRISMA.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un polipéptido de la invención, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen políesteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de los Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), polímero de ácido poli-láctico-coglicólico (PLGA) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como acetato de etilvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los polipéptidos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermodular mediante intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Para obtener una formulación de gel, la proteína de fusión de IL-22 Fc formulada en una composición líquida puede mezclarse con una cantidad eficaz de un polisacárido soluble en agua o polímero sintético para formar un gel (por ejemplo, un agente gelificante) tal como polietilenglicol para formar una formulación de la viscosidad apropiada para aplicar por vía tópica. El polisacárido o agente gelificante que puede usarse incluye, por ejemplo, derivados de celulosa tales como derivados de celulosa eterificados, incluyendo alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas y alquilhidroxialquilcelulosas, por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxipropilcelulosa; carboximetilcelulosa de sodio; polímeros en bloque POE-POP; poloxámero USP en diversos grados; ácido hialurónico; ácido poliacrílico tal como carbopol 940; almidón y almidón fraccionado; agar; ácido alginico y alginatos; goma arábica; pululano; agarosa; arragenina; dextranos; dextrina; fructanos; inulina; mananos; xilanos; arabinanos; quitosanos; glucógenos; glucanos; y biopolímeros sintéticos; así como gomas tales como goma de xantano; goma guar; goma de algarrobo; goma arábica; goma de tragacanto; y goma de karaya; y derivados, combinaciones y mezclas de los mismos. En una realización de la invención, el agente gelificante en el presente documento es uno que es, por ejemplo, inerte para sistemas biológicos, no tóxico, sencillo de preparar y/o no demasiado líquido o viscoso, y no desestabiliza la fusión de IL-22 Fc en él.

En determinadas realizaciones de la invención, el polisacárido es un derivado de celulosa eterificado, en otra realización uno que está bien definido, purificado y enumerado en USP, por ejemplo, metilcelulosa y los derivados de hidroxialquilcelulosa, tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa (todos denominados agentes celulósicos). En algunas realizaciones, el polisacárido es hidroxietilmetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa.

El polietilenglicol útil para gelificar es normalmente una mezcla de polietilenglicoles de bajo y alto peso molecular para obtener la viscosidad apropiada. Por ejemplo, una mezcla de un polietilenglicol de peso molecular 400-600 con uno de peso molecular 1500 sería eficaz para este fin cuando se mezcla en la relación apropiada para obtener una pasta.

Se entiende que el término "hidrosoluble" como se aplica a los polisacáridos y polietilenglicoles incluye soluciones y dispersiones coloidales. En general, la solubilidad de los derivados de celulosa se determina por el grado de sustitución de grupos de éter, y los derivados estabilizantes útiles en el presente documento deberían tener una cantidad suficiente de dichos grupos de éter por unidad de anhidroglucosa en la cadena de celulosa para hacer los derivados hidrosolubles. Un grado de sustitución de éter de al menos 0,35 grupos de éter por unidad de anhidroglucosa es en general suficiente. Adicionalmente, los derivados de celulosa pueden estar en forma de sales de metales alcalinos, por ejemplo, las sales de Li, Na, K o Cs.

En determinadas realizaciones, se emplea metilcelulosa en el gel, por ejemplo, comprende aproximadamente 1-5 %, o aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 % o aproximadamente 5 %, del gel y el polipéptido de IL-22 o la proteína de fusión de IL-22 Fc está presente en una cantidad de

aproximadamente 50-2000 µg, 100-2000 µg o 100-1000 µg por ml de gel. En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz de polipéptido de IL-22 o proteína de fusión de IL-22 Fc para curación de heridas por administración tópica puede ser de aproximadamente 25 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 300 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 250 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 150 µg, aproximadamente 75 µg, aproximadamente 100 µg, aproximadamente 125 µg, aproximadamente 150 µg, aproximadamente 175 µg, aproximadamente 200 µg, aproximadamente 225 µg, aproximadamente 250 µg, aproximadamente 300 µg o aproximadamente 350 µg, por cm<sup>2</sup> de área de herida.

- 10 Las formulaciones para usar para administración *in vivo* son en general estériles. Puede conseguirse fácilmente esterilidad, por ejemplo, por filtración mediante membranas de filtración estéril.

Se describen en el presente documento dosificaciones para los productos terapéuticos basados en IL-22. Por ejemplo, dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de polipéptido es una dosificación candidata inicial para administración al sujeto, bien, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o bien mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca una supresión deseada de síntomas de enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un polipéptido de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de polipéptido, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el polipéptido se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del sujeto y la respuesta al polipéptido, y el criterio del médico a cargo. El polipéptido se administra convenientemente al sujeto de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 20 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg--15 mg/kg) del polipéptido puede ser una dosificación candidata inicial para administración al sujeto, bien, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o bien mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantendría en general hasta que se produzca una supresión deseada de síntomas de enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del polipéptido estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al sujeto una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg o 20 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). En determinadas realizaciones, pueden administrarse al sujeto aproximadamente 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg o 20 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de forma intermitente, por ejemplo, cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el sujeto recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o por ejemplo aproximadamente seis dosis del polipéptido). Puede administrarse una dosis de carga mayor, seguida de una o más dosis menores. Un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Los compuestos de la invención para prevención o tratamiento de una enfermedad o afección cardiovascular, síndrome metabólico, endotoxemia aguda o septicemia, o diabetes se administran normalmente mediante inyección intravenosa.

También se pueden usar otros métodos de administración, que incluyen, pero sin limitación, administración tópica, parenteral, como intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, ocular, intraocular, intravítrea, intralesional, intracerebroespinal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral o inhalación. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un sujeto humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo.

## 60 I. Métodos terapéuticos y composiciones

Pueden usarse proteínas de fusión de IL-22 Fc proporcionadas en el presente documento en métodos terapéuticos.

### 65 a) Enfermedad inflamatoria del intestino

En un aspecto, se proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso como un medicamento. En aspectos

adicionales, se proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en el tratamiento de EII, incluyendo CU y EC. En determinadas realizaciones, se proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en un método de tratamiento. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene CU o EC que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína de fusión de IL-22 Fc. En una de dichas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe posteriormente. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en la potenciación de la proliferación, diferenciación y/o migración epitelial. En determinadas realizaciones particulares, el tejido epitelial es tejido epitelial intestinal. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en un método para potenciar la proliferación, diferenciación y/o migración epitelial en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína de fusión de IL-22 Fc para potenciar la proliferación, diferenciación y/o migración epitelial. En otras realizaciones más, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en el tratamiento de la diabetes, especialmente diabetes de tipo II, la curación de heridas diabéticas, síndromes metabólicos y aterosclerosis. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una proteína de fusión de IL-22 Fc para su uso en un método de tratamiento de la diabetes, especialmente diabetes de tipo II, la curación de heridas diabéticas, síndromes metabólicos y aterosclerosis en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la proteína de fusión de IL-22 Fc. Véase solicitudes de Genentech número de expediente PR5586, número de serie de solicitud 61/800795, titulada "Using an IL-22 polypeptide for wound healing", y PR5590, número de serie de solicitud 61/801144, titulada "Methods of treating cardiovascular conditions and metabolic syndrome using an IL-22 polypeptide", ambas presentadas el 15 de marzo de 2013.

Un "individuo" o "sujeto" o "paciente" según cualquiera de las realizaciones anteriores es preferentemente un ser humano.

Se describe además en el presente documento el uso de un polipéptido de IL-22 o proteína de fusión de IL-22 Fc en la fabricación o preparación de un medicamento. En un ejemplo el medicamento es para el tratamiento de EII y la curación de heridas. En un ejemplo adicional el medicamento es para su uso en un método para tratar la EII y curación de heridas que comprende administrar a un individuo que tenga EII una cantidad eficaz del medicamento. En uno de dichos casos el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe posteriormente. En un ejemplo adicional, el medicamento es para suprimir la respuesta inflamatoria en las células epiteliales del intestino. En un ejemplo adicional, el medicamento es para su uso en un método para potenciar la proliferación, diferenciación y/o migración epitelial en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para potenciar la proliferación, diferenciación y/o migración epitelial. Un "individuo" según cualquiera de los ejemplos anteriores puede ser un ser humano.

También se describe en el presente documento un método para tratar la EII, incluyendo CU y EC. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tenga EII una cantidad eficaz de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc. En uno de dichos casos, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe posteriormente. Un "individuo" según cualquiera de los ejemplos anteriores puede ser un ser humano.

Se describe además en el presente documento un método para potenciar la proliferación, diferenciación y/o migración epitelial en un individuo. En un ejemplo el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido de IL-22 o una proteína de fusión de IL-22 Fc para potenciar la proliferación, diferenciación y/o migración epitelial. En un caso, un "individuo" es un ser humano.

#### **b) Otras indicaciones terapéuticas**

La presente invención proporciona agentes terapéuticos basados en proteínas de fusión de IL-22 Fc para enfermedades y afecciones cardiovasculares, síndrome metabólico, endotoxemia aguda y septicemia, y diabetes. Para la prevención, el tratamiento o la reducción de la gravedad de una enfermedad o afección dada, la dosificación apropiada de un compuesto de la invención dependerá del tipo de enfermedad o afección para tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad o afección, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del sujeto y la respuesta al compuesto, y el criterio del médico a cargo. El compuesto se administra convenientemente al sujeto de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Preferentemente, es deseable determinar la curva de respuesta a dosis y la composición farmacéutica de la invención primero *in vitro*, y después en modelos animales útiles antes de ensayar en seres humanos.

Se describen en el presente documento métodos de tratamiento para una enfermedad o un trastorno cardiovascular, síndrome metabólico, endotoxemia aguda y septicemia, y un trastorno relacionado con la insulina. En un ejemplo el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc o un agonista de IL-22. También se describe en el presente documento un método para retardar o ralentizar la progresión de una enfermedad o un trastorno cardiovascular, síndrome metabólico y un trastorno relacionado con la insulina. En un ejemplo, el método comprende administrar al sujeto al

que se ha diagnosticado la enfermedad, la afección o el trastorno, una cantidad eficaz de un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc o un agonista de IL-22. Se describe además en el presente documento un método para prevenir indicaciones de una enfermedad o un trastorno cardiovascular y un trastorno relacionado con la insulina. En un ejemplo, el método comprende administrar una cantidad eficaz de un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc o un agonista de IL-22 a un sujeto en riesgo de tener la enfermedad, la afección o el trastorno, en donde el polipéptido de IL-22, la proteína de fusión de IL-22 Fc o el agonista de IL-22 es eficaz contra el desarrollo de indicaciones de la enfermedad, la afección o el trastorno.

#### Enfermedades y trastornos cardiovasculares

En un aspecto, las proteínas de fusión de IL-22 Fc proporcionan un efecto preventivo o profiláctico contra el desarrollo de, o la progresión de, indicaciones clínicas y/o histológicas y/o bioquímicas y/o patológicas (incluyendo tanto síntomas como señales) de enfermedades o afecciones cardiovasculares en un sujeto. En una realización, la enfermedad o afección es aterosclerosis. En una realización, las indicaciones incluyen formación de placas ateroscleróticas y/o inflamación vascular. En otra realización, el sujeto está en riesgo de tener enfermedad cardiovascular. En general, un sujeto en riesgo habrá tenido previamente una enfermedad o afección cardiovascular como se describe en el presente documento o tendrá una predisposición genética para una enfermedad o afección cardiovascular.

La eficacia del tratamiento de enfermedades y trastornos cardiovasculares puede medirse por diversas valoraciones habitualmente usadas en la evaluación de enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, puede valorarse la salud cardiovascular. La salud cardiovascular puede evaluarse mediante, pero sin limitación, por ejemplo, análisis de sangre (por ejemplo, colesterol total, LDL-C, HDL-C, triglicéridos, proteína C-reactiva, fibrinógeno, homocisteína, insulina en ayunas, ferritina, lipoproteína, LPS), tensión arterial, auscultación, electrocardiograma, ensayo de sobrecarga cardíaca, captura de imágenes cardíacas (por ejemplo, cateterización coronaria, ecocardiograma, ultrasonidos intravasculares, tomografía de emisión de positrones, angiografía de tomografía computarizada y captura de imágenes por resonancia magnética).

#### Síndrome metabólico

En un aspecto, las proteínas de fusión de IL-22 Fc proporcionan un efecto terapéutico, preventivo o profiláctico contra el desarrollo de, o la progresión de, indicaciones clínicas y/o histológicas y/o bioquímicas y/o patológicas (incluyendo tanto síntomas como señales) de síndrome metabólico (o trastorno o enfermedad metabólico) en un sujeto. En una o más realizaciones, el sujeto está en riesgo de tener síndrome metabólico.

La eficacia del tratamiento del síndrome metabólico puede medirse por diversas valoraciones habitualmente usadas en la evaluación del síndrome metabólico. Por ejemplo, puede medirse la obesidad. Como un ejemplo adicional, pueden medirse la hiperglucemia, dislipidemia, resistencia a la insulina, inflamación del tejido adiposo crónico y/o la hipertensión. Puede medirse la reducción de los niveles de uno o más de proteína C-reactiva, IL-6, LPS e inhibidor del activador de plasminógeno 1. Estas mediciones pueden realizarse por cualquier método bien conocido en la técnica.

#### Trastornos relacionados con la insulina

Para trastornos relacionados con la insulina, el término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas para el trastorno, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o el trastorno patológico diana. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno relacionado con la insulina así como los propensos a tener dicho trastorno o aquellos en los que se quiera prevenir el trastorno.

En un aspecto, las proteínas de fusión de IL-22 Fc proporcionan un efecto preventivo o profiláctico contra el desarrollo de, o la progresión de, indicaciones clínicas y/o histológicas y/o bioquímicas y/o patológicas (incluyendo tanto síntomas como señales) de un trastorno relacionado con la insulina en un sujeto. En una realización, el trastorno es diabetes de tipo I, diabetes de tipo II o diabetes gestacional. En una realización, la patología o las indicaciones patológicas incluyen una o más de: poca o ninguna producción de insulina por el páncreas (por ejemplo, células de islotes), resistencia a la insulina e hiperglucemia. En otra realización, el sujeto está en riesgo de tener un trastorno relacionado con la insulina. En general, un sujeto en riesgo tiene una predisposición genética para un trastorno relacionado con la insulina, se ha expuesto a un virus que desencadena la destrucción autoinmunitaria de células de islotes (por ejemplo, virus de Epstein-Barr, virus de Coxsackie, virus de las paperas o citomegalovirus), es obeso, es prediabético (niveles de azúcar en sangre mayores de lo normal), o tiene diabetes gestacional.

La eficacia del tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina puede medirse por diversas valoraciones habitualmente usadas en la evaluación de dichos trastornos. Por ejemplo, puede evaluarse diabetes tanto de tipo I como de tipo II con uno o más de los siguientes: un ensayo de hemoglobina glucosilada (A1C), un ensayo de azúcar regular y un ensayo de azúcar en sangre en ayunas. El tipo I también puede evaluarse ensayando con respecto a autoanticuerpos en la sangre y/o cetonas en la orina. El tipo II también puede evaluarse ensayando con respecto a

tolerancia a la glucosa oral.

#### Endotoxemia aguda y septicemia

En un aspecto, las proteínas de fusión de IL-22 Fc proporcionan un efecto terapéutico, preventivo o profiláctico contra el desarrollo de, o la progresión de, indicaciones clínicas y/o histológicas y/o bioquímicas y/o patológicas (incluyendo tanto síntomas como señales) de la endotoxemia aguda, septicemia, o ambas, en un sujeto. En una o más realizaciones, el sujeto está en riesgo de tener endotoxemia aguda, septicemia, o ambas.

La eficacia del tratamiento de la endotoxemia aguda, septicemia, o ambas puede medirse por diversas valoraciones habitualmente usadas en la evaluación de la endotoxemia aguda, septicemia, o ambas. Por ejemplo, puede medirse la reducción de los niveles de LPS o marcadores inflamatorios. Estas mediciones pueden realizarse por cualquier método bien conocido en la técnica.

#### Curación de heridas

Existen diversos modos de medir la curación de heridas. Con frecuencia se capturan imágenes para calcular dimensiones lineales, el perímetro y el área. El NIH tiene un programa gratuito, Image J, que permite medir áreas de heridas de una imagen. El pronóstico de curación final puede extrapolarse a partir de las velocidades de curación iniciales basándose en la migración de la periferia hacia el centro. Esto se realiza usando varias ecuaciones matemáticas, la más común de las cuales es una ecuación de Gilman modificada. Además de la inspección visual, la medición de curación de heridas también puede ayudarse de métodos espectroscópicos o IRM. Véase, por ejemplo, Dargaville *et al.*, Biosensors Bioelectronics, 2013, 41:30-42, Tan *et al.*, 2007, British J. Radiol. 80:939-48. Si la curación es lenta/inadecuada, pueden tomarse biopsias de los bordes de la herida para descartar o determinar la infección y la neoplasia maligna. En determinadas realizaciones, la aceleración o la mejora de la curación de heridas puede evaluarse comparando el cierre de la herida en heridas tratadas con IL-22 y de control. En determinadas realizaciones, la aceleración o mejora de la curación de heridas es al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % más rápida o mejor que el control.

En un determinado aspecto, la invención proporciona métodos para promover/acelerar/mejorar la curación de una herida con o sin infección activa, contaminación microbiana o colonización en la herida. Las proteínas de fusión de IL-22 Fc pueden usarse para tratar heridas infectadas o promover/acelerar/mejorar la curación de heridas infectadas. En determinadas realizaciones, las proteínas de fusión de IL-22 Fc pueden usarse para tratar heridas o promover/acelerar/mejorar la curación de heridas, en presencia de infección. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de IL-22 Fc pueden usarse para tratar heridas o promover/acelerar/mejorar la curación de heridas en presencia de contaminación microbiana o colonización con riesgo de infección. En realizaciones adicionales, el paciente que necesite tratamiento de curación de heridas puede ser un paciente diabético. En consecuencia, en algunas realizaciones, la herida es una herida diabética, por ejemplo, úlcera de pie diabético. En algunas realizaciones adicionales, la herida es una herida diabética infectada, por ejemplo, úlcera de pie diabético infectada.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de IL-22 Fc proporcionada en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, formulación farmacéutica comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc proporcionada en el presente documento y al vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una composición farmacéutica comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc proporcionada en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe posteriormente.

La proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención puede usarse solo o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un polipéptido de IL-22, una proteína de fusión de IL-22 Fc o un agonista de IL-22 de la invención puede coadministrarse con al menos un agente terapéutico adicional. En determinadas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un supresor inmunitario que reduce la respuesta inflamatoria incluyendo sin limitación metotrexato, inhibidor de TNF, antagonista de TNF, mesalacina, esteroide, dexametasona y azatioprina, y combinación de los mismos. Los agentes terapéuticos adicionales adecuados que reducen una respuesta inflamatoria incluyen sin limitación ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), mercaptopurina (también denominada 6-mercaptopurina o 6-MP) o combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la fusión de IL-22 Fc puede coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales que reducen una respuesta inflamatoria (por ejemplo, 5-ASA, 6-MP o un antagonista de TNF) para el tratamiento de la EII. En otras realizaciones determinadas, la fusión de IL-22 Fc puede coadministrarse con un antagonista de integrina tal como etrolizumab para el tratamiento de la EII. En una realización, la proteína de fusión de IL-22 Fc se usa en combinación con un agonista de IL-22.

Para acelerar la curación de heridas crónica, tal como para el tratamiento de úlcera de pie diabético, la administración de una proteína de fusión de IL-22 Fc puede combinarse con uno o más agentes de curación de heridas adicionales. Los agentes de curación de heridas adicionales adecuados incluyen sin limitación factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, FGF, IGF, PDGF, TGF y VEGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de angiogénesis (por ejemplo, HGF, TNF- $\alpha$ , angiogenina, IL-8, angiopoyetinas 1 y 2, Tie-2, integrina  $\alpha$ 5, metaloproteinasas de la matriz, óxido nítrico, COX-2), miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (por ejemplo, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D), miembros de la familia del factor de

crecimiento de la insulina (IGF) (por ejemplo, IGF-I, IGF-II), miembros de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF) (por ejemplo, TGF- $\alpha$  TGF- $\beta$ ) y oxígeno anabólico (terapia de vacío). En determinadas realizaciones, el polipéptido de IL-22 o la fusión de IL-22 Fc puede coadministrarse con uno o más agentes de curación de heridas adicionales descritos en el presente documento y/o uno o más agentes antibacterianos o

antibióticos adecuados para su uso en administración tópica. Véase documento WO2006/138468,

En dichas realizaciones, el antibiótico puede ser antibiótico de azufre que incluye sin limitación sulfadiacina de plata, es decir, silvadene. Los uno o más agentes adicionales coadministrados pueden administrarse simultáneamente, alternativamente o secuencialmente con

proteína de fusión de IL-22 o

En realizaciones a modo de ejemplo adicionales, si el objetivo es la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones cardiovasculares o síndrome metabólico, la administración de una

proteína de fusión de IL-22 Fc puede combinarse con o complementar la administración de los agentes reductores del colesterol tales como estatinas (por ejemplo, lovastatina, rosuvastatina, fluvastatina, atorvastatina, pravastatina y simvastatina), resinas de unión a ácido biliar (colestipol, sacarosa de colestiramina y colesvelam), ezetimibe o una combinación de ezetimibe-simvastatina; agentes antiplaquetarios tales como inhibidores de ciclooxigenasa (aspirina), inhibidores del receptor de adenosina difosfato (ADP) (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, ticlopidina), inhibidores de fosfodiesterasa (cilostazol), inhibidores de glucoproteína IIB/IIIA (abciximab, eptifibatida, tirofiban), inhibidores de la recaptación de adenosina (dipiridamol), inhibidores de tromboxano (inhibidores de tromboxano sintasa, antagonistas del receptor de tromboxano, terutroban); bloqueadores beta tales como alprenolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol, corteza de *Eucommia*, acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, celiprolol, esmolol, metoprolol, nebivolol, butaxamina, ICI-118.551 y SR 59230A; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) tales como captopril, zofenopril, agentes que contienen dicarboxilato (enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benacepril, imidapril, zofenopril), agentes que contienen fosfonato (fosinopril), casoquininas, lactoquininas, lactotri péptidos (Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro producidos por el probiótico *Lactobacillus helveticus* o derivados de caseína); bloqueadores del canal de calcio tales como dihidropiridinas (por ejemplo, amlodipina, aranidipina, azelnidipina, barnidipina, benidipina, cilnidipina, clevidipina, isradipina, efonidipina, felodipina, lacidipina, lercanidipina, manidipina, nifedipina, nifedipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina y pranidipina), fenilalquilamina (por ejemplo, verapamil), benzotiazepinas (por ejemplo, diltiazem), mibefradilo, bepridilo, fluspirileno y fendilina; diuréticos tales como diuréticos del asa de máxima eficacia (por ejemplo, furosemida, ácido etacrínico, torsemida y bumetanida), tiazidas (por ejemplo, ácido de hidroclorotiazida), inhibidores de anhidrasa carbónica (por ejemplo, acetazolamida y metazolamida), diuréticos ahorradores de potasio (por ejemplo, antagonistas de la aldosterona: espironolactona, y bloqueadores de canales de sodio epiteliales: amilorida y triamtereno), y diuréticos ahorradores de calcio, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Para trastornos relacionados con la insulina o síndrome metabólico, la administración de una

proteína de fusión de IL-22 Fc puede combinarse con o complementar la administración de diversos agentes terapéuticos. En el caso de la diabetes de tipo I (diabetes mellitus insulino dependiente o DMID), el polipéptido de IL-22, la proteína de fusión de Fc o agonista descrito en el presente documento se combinan con uno o más de terapia de reemplazo de insulina regular (incluyendo insulina de acción rápida y de acción larga), tratamiento de inmunosupresión, trasplante de islotes y terapia de células madre. En una realización, la terapia de reemplazo de insulina regular incluye, sin limitación, insulina regular (por ejemplo, Humulin R, Novolin R), insulina isófana (por ejemplo, Humulin N, Novolin N), insulina lispro (por ejemplo, Humalog), insulina aspart (por ejemplo, NovoLog), insulina glargina (por ejemplo, Lantus) e insulina detemir (por ejemplo, Levemir). En otras realizaciones, la terapia de reemplazo de insulina incluye además pramlintide (Symlin).

En el caso de la diabetes de II (diabetes mellitus no insulino dependiente o DMNID) o síndrome metabólico, la proteína de fusión de Fc descrita en el presente documento puede combinarse con uno o más de terapia de reemplazo de insulina (como se ha analizado anteriormente), un agente para reducir la producción de glucosa por el hígado, un agente para estimular la producción pancreática y la liberación de insulina, un agente que bloquea la degradación enzimática de carbohidratos o aumenta la sensibilidad a insulina. En una realización, el agente para reducir la producción de glucosa es metformina (por ejemplo, Glucophage, Glumetza). En otra realización, el agente para estimular la producción pancreática y la liberación de insulina glipídica (por ejemplo, Glucotrol, Glucotrol XL), gliburida (por ejemplo, DiaBeta, Glynase) y glimepirida (por ejemplo, Amaryl). En otra realización, el agente que bloquea la degradación enzimática de carbohidratos o aumenta la sensibilidad a insulina es pioglitazona (por ejemplo, Actos). En otra realización, la proteína de fusión de Fc puede combinarse con uno de los siguientes reemplazos para metformina: sitagliptina (por ejemplo, Januvia), saxagliptina (por ejemplo, Onglyza), repaglinida (por ejemplo, Prandin) y nateglinida (por ejemplo, Starlix). Exenatida (por ejemplo, Byetta) y liraglutida (por ejemplo, Victoza). En otra realización, la proteína de fusión de Fc se combina con un agente hipoglucémico oral, por ejemplo, sulfonilureas.

En el caso de la diabetes gestacional o síndrome metabólico, la fusión de Fc descrita en el presente documento se combina con una medicación de control del azúcar en sangre oral. En una realización, la medicación es gliburida.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y resultar ser "sinérgica", es decir el efecto conseguido cuando los principios activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resulta de usar los compuestos por separado. Puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los principios activos son: (1) 5 coformulados y administrados o suministrados de forma simultánea en una formulación de dosificación unitaria, combinada; (2) suministrados por alternación o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministran en terapia de alternación, puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se suministran secuencialmente, por ejemplo por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternación, se administra secuencialmente una dosificación eficaz de 10 cada principio activo, es decir en serie, mientras que en terapia de combinación, se administran juntas dosificaciones eficaces de dos o más principios activos.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y administración por 15 separado, en cuyo caso, la administración de la proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención puede realizarse antes de, simultáneamente y/o después de la administración del agente o los agentes terapéuticos adicionales. En una realización, la administración de la proteína de fusión de IL-22 Fc y la administración de un agente terapéutico adicional se realizan en un periodo de aproximadamente un mes, o en un periodo de aproximadamente una, dos o tres semanas, o en un periodo de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

Puede administrarse una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) mediante cualquier medio adecuado, incluyendo tratamiento parenteral, intrapulmonar, tópico e intranasal y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser cualquier vía 25 adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en el presente documento diversos programas de dosificación incluyendo, pero sin limitación, administraciones individuales o múltiples durante diversos puntos temporales, administración de embolada e infusión por pulsos.

La proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención se formularía, dosificaría y administraría de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. La proteína de fusión de IL-22 Fc se formula opcionalmente, aunque no es necesario, con uno 30 o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de la proteína de fusión presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general con las mismas dosificaciones y por vías de administración como se describe en el presente documento o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento o con cualquier dosificación y por cualquier vía que se haya 40 determinado empíricamente/clínicamente como adecuada.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de región Fc, la gravedad y la evolución de la 45 enfermedad, si la proteína de fusión se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta a la proteína de fusión de IL-22 Fc y el criterio del médico a cargo. La proteína de fusión de IL-22 Fc se administra convenientemente al paciente de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10 mg/kg) o de aproximadamente 0,1 µg/kg a 1,5 mg/kg (por ejemplo, 0,01 mg/kg - 1 mg/kg) de la proteína de fusión de IL-22 Fc puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, bien, por 50 ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o bien mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantendría en general hasta que se produzca una supresión deseada de síntomas de enfermedad. 55 Una dosificación a modo de ejemplo de la proteína de fusión de IL-22 Fc estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Otras dosificaciones determinadas incluyen el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg y de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,07 mg/kg, 60 0,08 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) pueden administrarse al sujeto. Para la curación de heridas tóxicas, una o más dosis de aproximadamente 0,001 mg/cm<sup>2</sup>- aproximadamente 10 mg/cm<sup>2</sup> de área de herida, aproximadamente 0,05 mg/cm<sup>2</sup>- aproximadamente 5 mg/cm<sup>2</sup> de área de herida, aproximadamente 0,01 mg/cm<sup>2</sup>- aproximadamente 1 mg/cm<sup>2</sup> de área de herida, aproximadamente 0,05 mg/cm<sup>2</sup>- aproximadamente 0,5 mg/cm<sup>2</sup> de área de herida, 65 aproximadamente 0,01 mg/cm<sup>2</sup>- aproximadamente 0,5 mg/cm<sup>2</sup> de área de herida, aproximadamente 0,05 mg/cm<sup>2</sup>-

aproximadamente 0,2 mg/cm<sup>2</sup> de área de herida o aproximadamente 0,1 mg/cm<sup>2</sup>- aproximadamente 0,5 mg/cm<sup>2</sup> de área de herida (o cualquier combinación de las mismas) pueden administrarse al paciente. En determinadas realizaciones, una o más dosis de aproximadamente 0,01 mg/cm<sup>2</sup>, 0,02 mg/cm<sup>2</sup>, 0,03 mg/cm<sup>2</sup>, 0,04 mg/cm<sup>2</sup>, 0,05 mg/cm<sup>2</sup>, 0,06 mg/cm<sup>2</sup>, 0,07 mg/cm<sup>2</sup>, 0,08 mg/cm<sup>2</sup>, 0,09 mg/cm<sup>2</sup>, 0,1 mg/cm<sup>2</sup>, 0,15 mg/cm<sup>2</sup>, 0,2 mg/cm<sup>2</sup>, 0,25 mg/cm<sup>2</sup>, 0,3 mg/cm<sup>2</sup>, 0,4 mg/cm<sup>2</sup>, o 0,5 mg/cm<sup>2</sup> de área de herida pueden administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis de la proteína de fusión de IL-22 Fc). Puede administrarse una dosis de carga mayor, seguida de una o más dosis menores. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o los métodos terapéuticos anteriores pueden llevarse a cabo usando conjugado de la invención además de una proteína de fusión de IL-22 Fc.

#### J. Artículos de fabricación

Se describe además en el presente documento y se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección elegida. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (ABPI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un conjugado de la invención en lugar de o además de una proteína de fusión de IL-22 Fc.

#### K. Ensayos de exploración y modelos animales

Como se ejemplifica en la sección de ejemplos, la IL-22, la proteína de fusión de IL-22 Fc y los agonistas de IL-22 pueden evaluarse en diversos ensayos basados en células y modelos animales de EII, enfermedades o afecciones cardiovasculares y síndrome metabólico.

Pueden obtenerse técnicamente modelos animales recombinantes (transgénicos) introduciendo la parte codificante de los genes de interés en el genoma de animales de interés, usando técnicas convencionales para producir animales transgénicos. Los animales que pueden actuar como una diana para la manipulación transgénica incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo babuinos, chimpancés y otros monos. Las técnicas conocidas en este campo para introducir un transgén en dichos animales incluyen microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, patente de los Estados Unidos 4.873.191); transferencia de genes mediada por retrovirus a líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); dirección génica en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814 [1983]); transferencia génica mediada por espermatozoide (Lavitrano *et al.*, Cell 57, 717-73 [1989]). Para revisión, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.736.866.

Para los fines de la presente invención, los animales transgénicos incluyen los que portan el transgén solamente en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgén puede integrarse como un transgén individual, o en concatémeros, por ejemplo, tándems de cabeza a cabeza o de cabeza a cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo celular particular también es posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 623-636 (1992).

La expresión del transgén en animales transgénicos puede supervisarse por técnicas convencionales. Por ejemplo, Puede usarse análisis por transferencia de Southern o amplificación por PCR para verificar la integración del transgén. El nivel de expresión de ARNm puede después analizarse usando técnicas tales como hibridación in situ,

análisis de transferencia de Northern, PCR o inmunohistoquímica.

Los animales pueden examinarse adicionalmente con respecto a señales de patología apropiada, tal como patología de enfermedad cardiovascular, por ejemplo por examen histológico y/o captura de imágenes o análisis por ultrasonidos para determinar la carga de placas ateroscleróticas y la función vascular (véase ejemplos posteriores).

También pueden realizarse experimentos de bloqueo en los que los animales transgénicos se tratan con IL-22, proteína de fusión de IL-22 Fc o un agonista candidato para determinar el alcance de los efectos en la formación de placas ateroscleróticas, incluyendo el tamaño, el número y el grado de formación de placas. En estos experimentos, se administran anticuerpos de bloqueo que se unen con el polipéptido de la invención al animal y se supervisa el efecto biológico de interés.

Como alternativa, pueden construirse animales "nuligénicos" que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica IL-22, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido de IL-22 y ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede usarse ADNc que codifica IL-22 para clonar ADN genómico que codifica IL-22 de acuerdo con técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica IL-22 puede suprimirse o reemplazarse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede usarse para supervisar la integración. Normalmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos tanto 5' como 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido se ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan después en un blastocisto de un animal (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), págs. 113-152]. Después puede implantarse un embrión quimérico en un animal hembra pseudoembarazada adoptivo y el embrión se lleva a término para crear un animal nuligénico. La descendencia que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede identificarse por técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales nuligénicos pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra determinadas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido de IL-22.

Por lo tanto, la actividad biológica de IL-22 o sus agonistas potenciales puede estudiarse adicionalmente en ratones nuligénicos para IL-22.

Se considera que la descripción escrita anterior es suficiente para permitir que un experto en la materia practique la invención. Los ejemplos siguientes se ofrecen para fines ilustrativos solamente y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 Clonación, expresión y purificación de la proteína de fusión de IL-22 Fc

Pueden aplicarse técnicas de clonación molecular general y purificación de proteínas en los siguientes experimentos.

#### *i. Clonación*

Se clonó IL-22 humana de longitud completa de una biblioteca de ADNc de colon humano (Genentech). Se generaron construcciones que expresaban proteína de fusión de IL-22 Fc IgG1 o IgG4 humanas para este experimento usando técnica de PCR solapante usando los siguientes cebadores: cebador directo de IgG1 de fusión de IL-22 Fc: TTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACT GGAGTACATTCAGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGC (SEQ ID NO:52), cebador inverso de IgG1 de fusión de IL-22 Fc AGGTCGACTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:53), cebador directo de IgG4 de fusión de IL-22 Fc: TTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACT GGAGTACATTCAGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGC (SEQ ID NO:54), cebador inverso de IgG4 de fusión de IL-22 Fc: AGGTCGACTTATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:55). Los productos de PCR se clonaron en vectores de expresión pRK5.sm (Genentech). La secuencia líder (o el péptido señal) se escindió en la célula y la fusión de IL-22 Fc madura no contenía la secuencia líder. Los clones que portaban enlaces artificiales se clonaron con cebadores que contenían las secuencias enlazadoras. La mutación de N297G se introdujo adicionalmente por PCR de mutagénesis usando los siguientes cebadores: cebador directo de IgG1 N297G: GCG GGA GGA GCA GTA CGG AAG CAC GTA CCG TGT GG (SEQ ID NO:56), cebador inverso de IgG1 N297G: CCA CAC GGT ACG TGC TTC CGT ACT GCT CCT CCC GC (SEQ ID NO:57), cebador directo de IgG4 N297G: ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC GGA AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC (SEQ ID NO:58) y cebador inverso de IgG4 N297G: GAC GCT GAC CAC ACG GTA CGT GCT TCC GAA CTG CTC CTC CCG CGG CTT TGT (SEQ ID NO:59). Se confirmaron las secuencias de todas las construcciones de IL-22Fc mediante secuenciación de ADN.

## ii. Cultivo celular

Se cultivaron células CHO en suspensión dividiendo el cultivo 2 veces por semana a  $0,3 \times 10^6$  células/ml en un incubador ajustado a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5 %.

## iii. Transfección de proteína de fusión de IL-22 Fc en células CHO y expresión de proteínas

Las células CHO se sembraron a  $1,23 \times 10^6$  células/ml en 720 ml de medio de cultivo. El complejo de transfección (1,6 ml de PEI + 800 ug de ADN en 80 ml de medio sin suero) se incubó durante 10 min antes de añadir a las células. El cultivo se incubó a 33 °C, CO<sub>2</sub> 5 % durante 24 horas. Después de cultivar adicionalmente durante 14 días, el sobrenadante del cultivo se recogió mediante centrifugación. Se purificó el medio acondicionado de CHO transitorio (sobrenadante de lo anterior) usando la columna de afinidad de proteína A MabSelect Sure (GE Healthcare). El eluato a pH bajo se neutralizó a pH 5,0 y se purificó además mediante una columna de filtración en gel (GE Healthcare). El pico eluido se agrupó, se formuló y se esterilizó por filtración. El estado de glucosilación de la región Fc de la proteína de fusión se analizó por espectrometría de masas como se analiza posteriormente.

## iv. Establecimiento de clones estables que expresan proteína de fusión de IL-22 Fc

El plásmido que codifica proteína de fusión de IL-22 Fc se introdujo en células CHO por transfección usando Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen). Después de la transfección, las células se centrifugaron y se volvieron a sembrar en placas en medio selectivo sin suero. Los aislados se seleccionaron para secreción de IL-22 Fc. Los clones con el mayor título, como se identificó por ELISA, se agrupó y cambió de escala después para producción.

## v. Expresión de proteína de fusión de IL-22 Fc en E. coli

La materia prima de fermentación de *E. coli* se homogeneizó y se acondicionó a PEI 0,4 % p/p pH 6,7 y se centrifugó. El producto del centrifugado se purificó usando una columna de afinidad de proteína A MabSelect Sure (GE Healthcare). El eluato a pH bajo se neutralizó hasta pH 5,0 y se purificó adicionalmente mediante una cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones se agruparon, se formularon y se esterilizaron por filtración.

## **Ejemplo 2 La proteína de fusión de IL-22 Fc mostró alto porcentaje de afucosilación en la región Fc**

En este estudio, se examinó el estado de glucosilación de la parte Fc de las proteínas de fusión de IL-22 Fc. Se digirieron muestras de proteínas de fusión de IL-22 Fc purificadas de células transfectadas de forma transitoria con tripsina (tripsina:IL-22 Fc 1:25, p/p) durante 2 horas a 37 °C. Las muestras se acidificaron con ácido trifluoroacético a una concentración final de 0,1 % y se inyectaron en una columna C18 calentada (PLRP-S, 1000A 8 um, Agilent) equilibrada con TFA 0,05 % en agua. Los productos de digestión se separaron por un gradiente de acetonitrilo lineal (5 a 60 %) durante un tiempo de 20 min. La columna se conectó directamente con el orificio de electronebulización de un espectrómetro de masas TOF Agilent 6520B y las masas de las fracciones eluidas se determinaron en un modo iónico positivo. Ya que las partes Fc de estas construcciones de fusión son estables en tripsina en estas condiciones de digestión, podría realizarse una comparación directa del estado de carbohidratos de diversas fusiones de IL-22.

Como se muestra en la Figura 2, las proteínas de fusión de IL-22 Fc tanto IgG1 como IgG4 mostraron niveles anormalmente altos de afucosilación. Las masas esperadas para un Fc glucosilado de un anticuerpo IgG1 monoclonal típico serían las marcadas como 53296, 53458 y 53620 Da del panel A en la Figura 2. Normalmente las especies de carbohidratos del núcleo en cada rama de la Fc consistirían cada una en la siguiente composición de carbohidrato: 4 especies de azúcares de N-acetil glucosamina, 3 de manosa y 1 de fucosa (como en el pico marcado 53296 en el Panel A). La adición de uno o dos azúcares de galactosa produciría los picos marcados 53458 y 53620 Da, respectivamente (Panel A). Se detectó una cantidad insignificante de moléculas que contenían restos de azúcar que carecían de fucosa en una rama del Fc ("-1 fucosa").

Sorprendentemente, todas las proteínas de fusión de IL-22 Fc IgG1 de diferentes construcciones en las que el dominio CH2 estaba glucosilado mostraron alto nivel de afucosilación, incluyendo restos de azúcar que carecían de fucosa en una rama ("-1 fucosa") y ambas ramas de Fc ("-2 fucosa"). Véase Figura 2, paneles B-D. Estas moléculas afucosiladas comprendían hasta el 30 % de las especies totales observadas. La afucosilación puede aumentar las actividades efectoras indeseables de la fusión de IL-22 Fc IgG1.

Se sabe que IgG4 tiene menos función efectora en comparación con IgG1. Inesperadamente, los resultados de análisis de espectrometría de masas también mostraron las especies glucosiladas de "-1 fucosa" y "-2 fucosa" en las regiones Fc digeridas con tripsina de la proteína de fusión de IL-22 Fc IgG4. Estas moléculas afucosiladas comprendían más del 50 % de las especies totales observadas. Figura 2, panel E. Los anticuerpos afucosilados tienen actividades de citotoxicidad ADCC o CDC muy potenciadas, una propiedad no deseable con estas proteínas de fusión de IL-22 Fc.

Posteriormente, se construyeron dos moléculas de IL-22 Fc adicionales, una que contenía Fc IgG1 y la otra Fc IgG4

en las que el resto en el Fc que normalmente estaría glucosilado (N297) se mutó a una glicina (N297G) evitando de este modo la unión del azúcar de núcleo normal. Se mostró que estas estaban desprovistas de cualquier azúcar en sus partes de Fc y ambas tenían sus pesos moleculares de Fc esperados basándose en su secuencias de aminoácidos (Figura 2 paneles F y G).

En resumen, la región Fc de las proteínas de fusión de IL-22 Fc humanas, fusión de Fc bien IgG1 o bien IgG4, mostró altos niveles de afucosilación, lo que puede dar como resultado actividades ADCC o CDC aumentadas, una propiedad no deseable para su uso como productos terapéuticos de IL-22. Por lo tanto, las variantes no glucosiladas se ensayaron en estudios adicionales.

### Ejemplo 3 Ensayo de actividad de proteína de fusión de IL-22 Fc IgG1 e IgG4 *in vitro*

IL-22 interacciona con el complejo del receptor de IL-22 y activa la ruta de señalización de Jak-Stat. La activación de STAT3 es un acontecimiento predominante en ruta de señalización mediada por IL-22. En este experimento, las actividades *in vitro* de proteínas de fusión de IL-22 Fc se midieron usando un ensayo indicador de luciferasa. Se modificaron técnicamente células HEK 293 para sobreexpresar el complejo del receptor de IL-22 IL22R1 y IL10R2. El día 1, se sembraron  $1 \times 10^5$  células 293 en placas de 24 pocillos en 0,4 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)+suero bovino fetal 10 % (FBS). El día 2, las células se transfectaron con un indicador de luciferasa conducido por STAT3 y un control de luciferasa de Renilla usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en 0,1 ml de medio de suero reducido (Gibco Poti-MEM con suero reducido en al menos 50 %). La construcción indicadora de luciferasa STAT3 contiene una construcción indicadora de luciferasa sensible a STAT3 que contiene repeticiones en tándem del elemento inducible por sis (EIS) y el gen indicador de luciferasa de luciérnaga. El día 3, las proteínas de fusión de IL-22 Fc producidas por clones de CHO transitorios o estables se valoraron en diferentes concentraciones en 0,5 ml de medio y se añadieron sobre células transfectadas. El día 4, los medios se retiraron y las células se lisaron con 100  $\mu$ l de tampón de lisis pasiva (proporcionado por el sistema de ensayo indicador Dual-Luciferase 1000). Se transfirieron veinte microlitros de lisados celulares a placas de 96 pocillos y se analizaron con sistema de ensayo indicador Dual-Luciferase 1000 en luminómetro (Promega). La CE50 se calculó basándose en la actividad dependiente de dosis en software GraphPad Prism (La Jolla, CA). Los valores de CE50 para diferentes construcciones de fusión de IL-22 Fc se muestran en la tabla 2 a continuación.

**Tabla 2**

| Construcciones de IL-22 Fc | Isotipo de Fc           | Enlazador                                        | Producción     | CE50 (pM) |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|----------------|-----------|
| 1                          | hulgG1                  | DKTHT (SEQ ID NO:32)                             | CHO            | 150-200   |
| 2                          | hulgG1                  | EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33)                        | CHO            | 350-500   |
| 3                          | hulgG1                  | VEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:34)                       | CHO            | 100-150   |
| 4                          | hulgG1                  | KVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:35)                      | CHO            | 50-75     |
| 5                          | hulgG1                  | KKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:36)                     | CHO            | 25-50     |
| 6                          | hulgG1                  | DKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:37)                    | CHO            | 25-50     |
| 7                          | hulgG1                  | VDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:38)                   | CHO            | 25-50     |
| 8                          | hulgG1                  | KVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39)                  | CHO            | 2,5-5     |
| 9                          | hulgG1                  | GGGDKTHT (SEQ ID NO:41)                          | CHO            | 50-75     |
| 10                         | hulgG1                  | GGGSTHT (SEQ ID NO:63)                           | CHO            | 50-100    |
| 11                         | hulgG1                  | EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)                        | CHO            | 50-100    |
| 12                         | hulgG1                  | DKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:64)                    | CHO            | 25        |
| 13                         | hulgG1                  | KVDKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:65)                  | CHO            | 25        |
| 14                         | hulgG1                  | DKTHT (SEQ ID NO:32) N297A                       | CHO            | 150-200   |
| 15                         | hulgG1                  | EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40) N297A                  | CHO            | 50-100    |
| 16                         | hulgG1                  | DKTHT (SEQ ID NO:32) (N297G)                     | CHO            | 150-200   |
| 17                         | hulgG1                  | EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40) (N297G)                | CHO            | 50-100    |
| 18                         | hulgG1                  | KKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:66) (N297G)             | CHO            | 20        |
| 19                         | hulgG4                  | SKYGPP (SEQ ID NO:43)                            | CHO            | 150-200   |
| 20                         | hulgG4                  | SKYGPP (SEQ ID NO:43) N297G                      | CHO            | 75-100    |
| 21                         | hulgG4                  | RVESKYGPP (SEQ ID NO:44)                         | CHO            | 25-50     |
| 22                         | hulgG4                  | RVESKYGPP (SEQ ID NO:44) N297G                   | CHO            | 50-75     |
| 23                         | hulgG1                  | ELKTPPLGDTTHT (SEQ ID NO:42) (enlazador de IgG3) | CHO            | 50-75     |
| 24                         | hulgGI                  | EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)                        | <i>E. coli</i> | 16        |
| 25                         | hulgGI-IL-22 monomérico | EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)                        | <i>E. coli</i> | 82        |

Se construyó un gran número de proteínas de fusión de IL-22 Fc con enlazadores de diferente longitud y secuencias para examinar las actividades, la estabilidad y el rendimiento de cada diseño. Se prefieren enlazadores con

secuencia de IgG nativas para minimizar el riesgo potencial de inmunogenicidad; sin embargo, se consideraron enlazadores con secuencias exógenas que mostraron buena actividad *in vitro* y están abarcados por la presente invención.

- 5 La proteína de fusión de IL-22 Fc IgG1 que contenía el enlazador DKTHT (SEQ ID NO: 32) se ensayó en el ensayo de luciferasa de STAT3. Véase tabla 2. Para mejorar la CE50 de la proteína de fusión, la longitud del enlazador se aumentó de 5 a 10 aminoácidos que contenían la secuencia de IgG1 nativa EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 33). La proteína de fusión de IL-22 Fc resultante, sin embargo, mostró actividad *in vitro* reducida. Véase tabla 2. Sorprendentemente, un aumento de la longitud del enlazador incluso de un aminoácido VEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 34) mejoró la actividad de la proteína de fusión de IL-22. Aumentos adicionales de la longitud del enlazador dio como resultado mejora adicional de la actividad. Véase tabla 2.

- En experimentos separados, la Cys en EPKSCDKTHT se cambió a Ser para retirar el potencial de formación de enlaces disulfuro. Como se muestra en la tabla 2, la fusión de IL-22 Fc con el enlazador EPKSSDKTHT (SEQ ID NO: 40) mostró actividad mejorada en comparación con la secuencia enlazadora parental con el resto de Cys. La secuencia enlazadora más larga que incorporaba las secuencias cadena arriba (en el dominio CH1 de IgG1) mejoró adicionalmente la actividad. Las construcciones con mutación N297G mostraron valores de CE50 similares en comparación con los homólogos de tipo silvestre. La proteína de fusión de IL-22 Fc IgG1 (N297G) (SEQ ID NO: 12) y proteína de fusión de IL-22 Fc IgG4 (N297G) (SEQ ID NO: 8) se eligieron para estudios adicionales.

- Las actividades *in vitro* de proteína de fusión de IL-22 Fc IgG1 (N297G) humana (SEQ ID NO: 12) o proteína de fusión de IL-22 Fc IgG4 (N297G) (SEQ ID NO: 8) expresada de clones estables se ensayaron en el mismo ensayo. Los datos en la Figura 4 muestran resultados representativos. Las proteínas de fusión de IL-22 Fc tanto IgG1 como IgG4 indujeron actividad de STAT3 de una manera dependiente de dosis. Ambas proteínas de fusión de IL-22 Fc mostraron potencia similar. Las proteínas de fusión de IL-22 Fc expresadas de células transfectadas de forma transitoria mostraron resultados similares (datos no mostrados). Como control, la proteína de IL-22 nativa producida en células CHO se ensayó en el mismo ensayo y mostró potencia de dos a tres veces mayor que las proteínas de fusión de IL-22 Fc.

- En resumen, las proteínas de fusión de IL-22 Fc tanto IgG1 como IgG4 mostraron actividad *in vitro* demostrada por ensayo de luciferasa de STAT3. Además, se mostró que las proteínas de fusión de IL-22 Fc con enlazadores de diferente longitud y diferentes secuencias activaban la actividad luciferasa mediada por IL-22R.

#### **Ejemplo 4 Las proteínas de fusión de IL-22 Fc redujeron los síntomas de colitis inducida por DSS en ratones**

- La colitis inducida por dextrano sulfato de sodio (DSS) es un modelo de colitis de ratón habitualmente aceptado. La administración oral de agua que contiene DSS daña rápidamente las células epiteliales del colon y provoca pérdida de peso corporal sustancial y alteración de la estructura epitelial del colon caracterizada por tinción inmunohistoquímica (IHQ) o puntuación clínica de histología por el patólogo. En este estudio de prueba de concepto, se ensayó el efecto de la proteína de fusión de IL-22 Fc en colitis inducida por DSS.

- En ratones C57BL/6, se indujo colitis con agua para beber que contenía DSS 3,5 % durante cinco días consecutivos comenzando desde el día 0. IL-22 Fc IgG2a de ratón (SEQ ID NO: 60), un sustituto para proteína de fusión de IL-22 Fc, se administró a través de la vía intraperitoneal a 5 mg/kg el día -1, 1, 4 y 6. El peso corporal de los animales se midió diariamente. El día 8, todos los animales se sacrificaron y se estudió la histología del colon tanto mediante tinción de IHQ como mediante puntuación histológica manual.

- Como se muestra en la Figura 5, la colitis inducida por DSS se asocia con una pérdida de peso corporal drástica (Figura 5A), daño epitelial colónico e inflamación del colon (Figura 5B) y alta puntuación de histología (Figura 5C). El tratamiento con IL-22Fc evitó significativamente la pérdida de peso, restauró la integridad epitelial, disminuyó la inflamación y redujo la puntuación de histología. Véase Figura 5. La eficacia de IL-22 Fc superó el efecto de la dexametasona, el tratamiento de referencia (TDR) que provocó una pérdida de peso corporal significativa en este estudio.

#### **Ejemplo 5 Estudio de farmacocinética de proteína de fusión de IL-22 Fc**

- El estudio piloto de seguridad y estudio de PKPD en monos cynomolgus fue aprobado por el comité de cuidado y uso animal institucional (IACUC). El estudio se realizó en los servicios preclínicos de Charles River Laboratories (CRL) (Reno, NV). Un total de 15 monos cynomolgus (4-5 kg) de la reserva de CRL se asignaron aleatoriamente a cinco grupos (n = 3/grupo). A los animales del grupo 1 se les proporcionó una dosis intravenosa (i.v.) del vehículo de control los días 1 y 8. A los animales de los grupos 2 y 3 se les proporcionó una única dosis de embolada i.v. de IL22-Fc IgG1 a 0,15 y 1,5 mg/kg, respectivamente, los días 1 y 8. A los animales de los grupos 4 y 5 se les proporcionó una única dosis de embolada i.v. de IL22-Fc IgG4 a 0,15 y 1,5 mg/kg, respectivamente, los días 1 y 8. Se recogieron muestras de suero en diversos puntos temporales para análisis de PK y PD hasta el día 43 y se evaluaron las concentraciones de IL22-Fc mediante ELISA.

Para análisis de IL-22-Fc humano en suero de mono cynomolgus, se usó mAb de ratón anti IL-22 humana (Genentech) como un anticuerpo de captura en un ensayo de ELISA. La proteína de fusión de IL-22 Fc recombinante se usó para desarrollar una curva patrón. Se detectó IL-22-Fc unido a placa durante una incubación de 1 hora con mAb panmurino anti Fcy humano conjugado con HRP (Genentech) diluido a 500 ng/ml en tampón de ensayo. Después de un lavado final, se añadió sustrato de tetrametil bencidina peroxidasa (Moss, Inc., Pasadena, MD), el color se reveló durante 15 minutos y la reacción se detuvo con ácido fosfórico 1 M. Las placas se leyeron a 450 nm con una referencia de 620 nm usando un lector de microplacas. Las concentraciones de fusión de IL-22 Fc se calcularon a partir de un ajuste de cuatro parámetros de la curva patrón de fusión de IL-22 Fc.

Para cálculos de datos de PK, el día de estudio 1 se convirtió en día 0 de PK para indicar el inicio de la administración de dosis. Todos los puntos temporales después del día de dosificación en vida se calculan como día del estudio menos 1. Los datos de concentración en suero para cada animal se analizaron usando análisis de 2 compartimentos con WinNonlin®, Versión 5.2.1 (Pharsight; Mountain View, CA).

Las concentraciones en plasma de IL22-Fc mostraron una reducción biexponencial después de dosificación i.v. (0,15 mg/kg y 1,5 mg/kg) con una fase de distribución corta y una fase de eliminación terminal larga. Véase Figura 6. El modelo de dos compartimentos con eliminación lineal de IL-22 Fc del compartimento central describió bien los perfiles farmacocinéticos para ambas dosis, lo que sugiere una disposición mediada por diana insignificante en estos intervalos de dosis.

La concentración en suero máxima ( $C_{\max}$ ) y el área bajo la curva (ABC) de concentración en suero-tiempo estimada por el análisis bicompartimental fueron aproximadamente lineales y proporcionales a la dosis. Véase tabla 3. La cinética proporcional a la dosis sugirió saturación de IL-22R a las dosis ensayadas. Como se muestra en la Figura 6, la fusión de IL-22 Fc IgG4 mostró inesperadamente una EL 2 veces más lenta y exposición más de 2 veces mayor en comparación con la fusión de Fc IgG1. Sin limitarse a mecanismos particulares, la eliminación (EL) más rápida de IgG1 puede deberse a menor estabilidad de la construcción de fusión de IgG1 debido a que la EL más de 2 veces más rápida de la fusión de IL-22 Fc IgG1 parecía estar conducida principalmente por un volumen mayor de distribución. Las semividas beta de 4 - 5 días fueron similares entre fusiones de IgG1 e IgG4.

**Tabla 3**

| Grupo           | ABC (día • µg/ml) | $C_{\max}$ (ug/ml) | EL (ml/día/kg) | Beta SV* (día) |
|-----------------|-------------------|--------------------|----------------|----------------|
| IgG1 0,15 mg/kg | 4,47 ± 0,603      | 2,70 ± 0,607       | 34,0 ± 4,26    | 4,02 ± 0,478   |
| IgG1 1,5 mg/kg  | 51,1 ± 9,70       | 30,5 ± 4,14        | 30,1 ± 6,18    | 5,33 ± 0,580   |
| IgG4 0,15 mg/kg | 11,3 ± 0,752      | 3,99 ± 0,432       | 13,3 ± 0,853   | 4,61 ± 0,394   |
| IgG4 1,5 mg/kg  | 102 ± 18,9        | 33,4 ± 4,02        | 15,0 ± 2,58    | 5,80 ± 0,770   |

\*Semivida beta

#### **Ejemplo 6 Evaluación de la actividad *in vivo* de IL-22Fc en mono cynomolgus**

Los monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) se trataron por vía intravenosa con fusión de IL-22 Fc del isotipo IgG1 o IgG4 según se indica, a dosis de 0,15 mg/kg o 1,5 mg/kg. La unión de IL-22 con el receptor de IL-22 desencadena la expresión de varios genes incluyendo amiloide de suero A (SAA), RegIII/proteína asociada a pancreatitis (PAP, también denominada PancrePAP) y proteína de unión a lipopolisacárido (LPS-BP). En este estudio, las actividades *in vivo* de proteína de fusión de IL-22 Fc se analizaron midiendo la expresión de SAA, PancrePAP y LPS-BP. Se obtuvieron muestras de suero durante un periodo de tiempo antes y después de la dosis, como se indica en el gráfico. Los niveles en circulación de SAA de mono se cuantificaron en suero usando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) comercial (n.º de catálogo 3400-2) disponible de Life Diagnostics (West Chester, PA). Los niveles en circulación de RegIII/PAP se cuantificaron en suero usando un kit de ELISA comercial (catálogo PancrePAP) producido por Dynabio (Marsella, Francia).

Los niveles de proteína de unión a lipoproteína (LBP) en muestras de suero se determinaron usando un ELISA cualificado. Se aplicó lipoproteína biotinilada (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) sobre una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (Thermo; Rockland, IL). LBP recombinante humana (R&D Systems, Inc., Mineápolis, MN) se usó como un patrón en los ensayos. El analito de LBP unido se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti LBP (Thermo, Rockland, IL). Se usó fragmento F(ab')<sub>2</sub>, Fc de cabra, anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) para detección. Las señales colorimétricas se visualizaron después de la adición de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La reacción se detuvo mediante la adición de ácido fosfórico 1 M y la absorbancia se midió a 450 nm usando 650 nm como referencia en un lector de placas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Todas las muestras de ELISA se procesaron según las especificaciones del fabricante y se prepararon a una única dilución por duplicado o a cuatro diluciones en serie individualmente y las concentraciones se interpolaron a partir de una curva patrón. Se indicó el valor medio de cada muestra.

Como se muestra en la Figura 7, los niveles de proteínas SAA, LPS-BP y RegIII/PAP en suero fueron inducidos por IL-22Fc *in vivo*. Se observaron respuestas dependientes de dosis *in vivo* en primates no humanos, lo que indica

interacción de IL-22R y sugiere saturación por IL-22Fc. En la mayoría de los casos, no se observó ningún aumento en los niveles de proteínas en suero 24 horas después de la segunda dosis, lo que sugiere que las proteínas SAA, LPS-BP y RegIII/PAP en suero habían alcanzado los niveles máximos. Los niveles en suero de las tres proteínas se redujeron lentamente durante el periodo de recuperación de 35 días, volviendo a la línea basal en la mayoría de animales. La excepción es los niveles de RegIII/PAP en el grupo de alta dosis de IgG4, que parecía permanecer elevado durante el periodo de 42 días. Esto puede reflejar PK mejorada y exposición aumentada por ABC para la proteína de fusión de IL-22 Fc IgG4 en comparación con la proteína de fusión de IL-22 Fc IgG1.

#### **Ejemplo 7 - Tratamiento con IL-22 de ratones propensos a la aterogenia (Ldlr<sup>-/-</sup>-Apobec1<sup>-/-</sup>)**

Estudios recientes han revelado el papel de la IL-22 en la defensa del hospedador contra microbios patógenos. Sus efectos beneficiosos sobre la homeostasis del tejido mucoso y la inmunidad han conducido a los inventores a especular que el tratamiento con IL-22 podría aliviar la endotoxemia y sus consecuencias patológicas incluyendo la dislipidemia aterógena, inflamación sistémica y en última instancia ralentización de la progresión de enfermedad aterosclerótica y trastornos relacionados incluyendo diabetes.

Para ensayar esta hipótesis se trataron ratones propensos a la aterogenia (Ldlr<sup>-/-</sup>-Apobec1<sup>-/-</sup>) con una construcción de IL-22-Fc. Estos ratones carecen del receptor de LDL y sintetizan exclusivamente apoB100. Este modelo es único porque recapitula mucha de la patofisiología asociada con la hipercolesterolemia familiar humana. Específicamente, con una dieta de pienso, estos ratones desarrollan colesterol LDL elevado, un perfil lipídico con una distribución de colesterol similar a los seres humanos y formación de placas progresiva. Además, los ratones Ldlr<sup>-/-</sup>-Apobec1<sup>-/-</sup> tienen factores de riesgo medibles que contribuyen a su enfermedad cardiovascular, incluyendo resistencia a la insulina, inflamación sistémica, carga de placas progresiva y disfunción de células endoteliales. Aquí se demuestra que los 3 meses de tratamiento con la proteína de fusión de IL-22-Fc pueden mejorar drásticamente la salud cardiovascular de estos animales y reducir la progresión aterosclerótica.

#### Materiales y métodos

**Construcciones de IL-22-Fc de ratón.** La construcción de IL-22-Fc y el polipéptido usado en el presente documento fueron normalmente una proteína de fusión de IL-22-Fc de ratón (SEQ ID NO: 73) como se muestra en la Figura 32A (y secuencia de ADN que la codifica como se muestra en la Figura 32B, SEQ ID NO: 72). La proteína se produjo en células CHO por transfecciones transitorias de ADN plasmídico. La proteína de fusión se purificó pasando el sobrenadante celular por una columna de proteína A seguido de cromatografía de intercambio iónico para eliminar agregados. La semivida en suero se estimó inyectando una única dosis de 10 mg/kg de IL-22-Fc en un ratón C57B6 seguido de la obtención de suero de los ratones en intervalos temporales especificados. Los niveles en suero de IL-22-Fc se determinó por ELISA de tipo sándwich usando mAb anti IL-22. Para los estudios *in vivo* usando los ratones doble KO Ldlr<sup>-/-</sup>-Apobec1<sup>-/-</sup> se utilizó una construcción de IL-22-Fc de ratón. Aunque se presentan y se han usado en los ejemplos secuencias de ratón, se espera que en diversas realizaciones secuencias humanas puedan reemplazar las secuencias de ratón.

**Estudios de ratón.** Se criaron ratones doble KO Ldlr<sup>-/-</sup>-Apobec1<sup>-/-</sup> en las instalaciones de cría de Genentech y los ratones C57BL/6 WT se obtuvieron de Jackson Laboratory. Los ratones se mantuvieron en una instalación animal sin patógenos a 21 °C en un ciclo convencional de 12 h de luz/12 h de oscuridad con acceso a pienso: un pienso de roedor convencional (Labdiet 5010, 12,7 % de calorías de grasa) o una dieta alta en grasas, alta en carbohidratos (Harlan Teklad TD.03584, 58,4 % calorías de grasa) y agua a voluntad. Los ratones db/db en fondo C57BLKS/J fueron hembras y otros ratones usados en el estudio fueron todos machos. El IL-22-Fc de ratón o anticuerpo IgG de control se administró mediante vía intraperitoneal (ip) comenzando a los 6 meses de edad a 50 µg/semana durante tres meses (total de 12 dosis semanales).

**Análisis de carga aterosclerótica.** Se usó microtomografía computarizada de rayos x de alta resolución para cuantificar el volumen de lesiones ateroscleróticas y la composición de placas ateroscleróticas. Los animales se sacrificaron con inhalación de dióxido de carbono, después se les perfundió a través del ventrículo cardíaco izquierdo con diez mililitros de solución salina tamponada con fosfato y después diez mililitros de formalina tamponada neutra al diez por ciento. Las aortas se diseccionaron y se sumergieron en formalina tamponada neutra al diez por ciento durante un mínimo de veinticuatro horas y se transfirieron a una solución de agente de contraste de rayos x basado en yodo al veinte por ciento, Isovue 370 (Bracco Diagnostics Inc., Princeton, NJ) en formalina tamponada neutra al diez por ciento durante un mínimo de doce horas. Después de secar por transferencia, las aortas se perfundieron y se sumergieron en aceite de soja (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), un medio de captura de imágenes de fondo de baja intensidad de rayos x. Se obtuvieron imágenes de microtomografía computarizada usando el µCT40 (Sanco Medical, Basserdorf, Suiza) con energía de adquisición de imágenes de 45 kV, una corriente de 160 µA, un tiempo de integración de 300 milisegundos con tres promedios y resolución de imágenes de doce micrómetros. Las imágenes resultantes se analizaron con Analyze (AnalyzeDirect Inc., Lenexa, KS) empleando filtración morfológica semiautomática y regiones definidas por el usuario para determinar volúmenes de objetos y composición de objetos.

**Evaluación de la función vascular.** La función vascular se determinó por examen por ultrasonidos de la arteria

femoral para dilatación mediada por flujo y dilatación mediada por nitroglicerina. Se anestesió a los animales con isoflurano dos por ciento, y se mantuvieron a treinta y siete grados Celsius durante un examen de ultrasonidos de veinte minutos. Se usó Nair para retirar el pelo de la superficie ventral de las extremidades posteriores y permitir la captura de imágenes por ultrasonidos usando el Vevo770 con una sonda de captura de imágenes de cincuenta y cinco megahercios (VisualSonics, Toronto, Canadá). Para dilatación mediada por flujo, se recogió una imagen de línea basal de la arteria femoral y después se usó una goma como un torniquete temporal para ocluir el flujo de sangre de la arteria femoral durante cuatro minutos. Después se soltó la goma para el reflujo de la arteria femoral y se adquirió una imagen cada minuto durante cuatro minutos y se analizó con respecto al diámetro máximo de la arteria femoral usando herramientas de software proporcionadas por el fabricante. Para dilatación mediada por nitroglicerina, se recogió una imagen de línea basal de la arteria femoral y después se administró una inyección intraperitoneal de 20 microgramos de nitroglicerina (Baxter, Deerfield, IL) y se adquirió una imagen cada minuto durante cuatro minutos y se analizó con respecto al máximo diámetro de la arteria femoral usando herramientas de software proporcionadas por el fabricante.

**Determinación de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas totales.** Se usaron muestras de suero nuevas para determinar la distribución de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas totales según las instrucciones del fabricante usando el sistema de análisis Cholestech LDX (Inverness Medical, Princeton, NJ).

**Medición de lipopolisacáridos en sueros.** Las muestras de sueros congeladas se descongelaron y diluyeron cien veces en agua sin endotoxinas y se incubaron a noventa grados Celsius durante diez minutos en un baño de agua caliente. Las muestras se procesaron después según las instrucciones de fabricación en el sistema de Endosafe-PTS (Charles River Laboratories, Wilmington MA).

**GTT: Ensayo de tolerancia a la glucosa.** El ensayo de tolerancia a la glucosa (ETG) se realizó al final del periodo de dosificación con inyección de glucosa i.p. 1 g/kg después de ayuno durante una noche (14 h). Se midieron los niveles de glucosa usando glucómetro One Touch Ultra. El consumo de alimento se calculó durante el estudio alojando individualmente los ratones durante 4 días de periodo de aclimatación seguido de la medición de un periodo de una semana.

**Medición de los niveles de citocina en suero.** Los niveles de citocina en suero se midieron usando panel múltiple Luminex 23 (BioRad) mediante un método automático. Algunos de los resultados se confirmaron de forma independiente mediante kits de ELISA individuales (R&D). El colesterol total y los ácidos grasos libres (FFA) (Roche) se determinaron usando reacciones enzimáticas.

## Resultados:

**Los ratones Ldlr<sup>-/-</sup>Apobec1<sup>-/-</sup> son un modelo preciso de dislipedia aterógena y fueron sensibles a exposiciones inflamatorias.** El modelo de ratón Ldlr<sup>-/-</sup>Apobec1<sup>-/-</sup> presenta niveles de lipoproteínas y lesiones ateroscleróticas extensivas características de enfermedad aterosclerótica en seres humanos (Powell-Braxton *et al.* (1998). Nat Med 4(8): 934-8). El análisis de MicroCT del arco aórtico de ratones Ldlr<sup>-/-</sup>Apobec1<sup>-/-</sup> reveló señales de enfermedad aterosclerótica como se determinó usando una técnica de procesamiento de imágenes automática en muestras preparadas que incluyeron la aorta ascendente, el arco de la aorta, la aorta descendente y parte de la arteria braquiocéfálica. Esta técnica también demostró un alto grado de heterogeneidad que reflejaba la variación regional en la gravedad y progresión de carga de aterosclerosis que incluía núcleo lipídico, regiones de placa rota y calcificación (Figura 8). La heterogeneidad de la señal de TC refleja la patología subyacente de las lesiones coherentes con la patología de placas compleja de la enfermedad humana. Para caracterizar este modelo y demostrar su sensibilidad a la aterogénesis inducida por dieta, la cohorte de ratones se trataron con una dieta alta en grasas o añadiendo fructosa a su agua para beber (8 % p/v) durante 2 meses. Los ratones Ldlr<sup>-/-</sup>Apobec1<sup>-/-</sup> demostraron sensibilidad a estas alteraciones dietéticas con LDL en suero aumentada solo moderadamente pero con un aumento significativo en la carga de aterosclerosis total en comparación con ratones en dieta de pienso convencional (Figura 9). Esto demuestra que el aumento de la carga de aterosclerosis probablemente se deba a inflamación en lugar de aumento de LDL. Además, una estimulación de inflamación de grado bajo aguda con exposición a LPS (0,025 mg/kg) dio como resultado un aumento notable de marcadores proinflamatorios en el Ldlr<sup>-/-</sup>Apobec1<sup>-/-</sup> en comparación con controles wt (Figura 10). Los ratones Ldlr<sup>-/-</sup>Apobec1<sup>-/-</sup> también se expusieron a dosificación de LPS crónica (750 ng, ip) durante 8 semanas y se evaluaron con respecto a perfil lipídico y carga de placas. Como se muestra en la Figura 11, la exposición a endotoxina crónica da como resultado dislipidemia y mayor inestabilidad de placas.

Tras el tratamiento con IL-22-Fc, se vieron mejoras en la dislipidemia aterógena y síntomas de síndrome metabólico en los ratones Ldlr<sup>-/-</sup>Apobec1<sup>-/-</sup>. Estos ratones desarrollan características de síndrome metabólico, incluyendo resistencia a la insulina, con una dieta de pienso. Con el tratamiento de IL-22-Fc, la glucosa en sangre en ayunas se redujo en comparación con controles y la eliminación de glucosa se mejoró en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control (Figura 12). Por lo tanto, la homeostasis de la glucosa se mejoró con una normalización de la tolerancia a la glucosa (ETG) y mejora de la glucosa en ayunas (Figura 12). Se redujo la hipercolesterolemia tanto con alimentación como en ayunas (Figura 13A) así como los niveles de TG con alimentación (Figura 13B) y se mejoraron los perfiles lipídicos (Figura 14). Los niveles de LPS en plasma se

redujeron después del tratamiento con IL-22-Fc (Figura 15). Además de la reducción de dislipidemia y sensibilización a la insulina, se vio mejora en la función endotelial medida por reactividad vascular (Figura 16). De forma coherente con una mejora en la dislipidemia, el análisis por TC del volumen de placas mostró una reducción de la carga aterosclerótica total en el arco aórtico y en la arteria braquiocefálica y válvulas de la aorta (Figuras 17A-C). La mejora del perfil lipídico y la resistencia a la insulina no se debieron a una reducción del consumo calórico ya que el consumo de alimento, medido durante un periodo de 7 días, aumentó a pesar de una reducción modesta pero estadísticamente significativa en el peso corporal que se produjo durante los 3 meses de tratamiento (Figura 18). El peso corporal en el grupo de control no cambió durante el protocolo de tratamiento de 3 meses y el grupo de tratamiento de IL-22-Fc mostró una reducción significativa del peso corporal entre el inicio y el final del estudio (Figura 18A). El consumo de alimento diario promedio durante un periodo de 7 días durante el transcurso del estudio de tratamiento se elevó en el grupo de tratamiento de IL-22-Fc en comparación con el grupo de control (Figura 18B).

#### **Ejemplo 8 - Modelo de arteriopatía periférica**

La estimulación de rutas reguladas por IL-22 mediante IL-22-Fc para reducir la progresión aterosclerótica es una forma potencialmente nueva de terapia para sujetos con enfermedad cardiovascular y trastorno relacionado incluyendo diabetes y nefropatía crónica. Debido a que la enfermedad cardiovascular, normalmente, no está limitada a una región de la vasculatura de un sujeto, un sujeto al que se diagnostica como aquejado de o en riesgo de tener arteriopatía coronaria también se considera en riesgo de desarrollar o tener otras formas de ECV tales como enfermedad cerebrovascular, enfermedad aórtica-iliaca y arteriopatía periférica. La misma estrategia descrita anteriormente puede usarse para validar IL-22 como una diana usando un modelo de arteriopatía periférica de ratón. Las construcciones de IL-22-Fc se preparan y se evalúan como se ha descrito anteriormente. También se usan todos los controles necesarios. Los agonistas/antagonistas de IL-22 se evalúan y los resultados validarán las rutas de IL-22 como una diana para el descubrimiento y desarrollo de fármacos.

Se usa un modelo de arteriopatía periférica (APP) basándose en el ligamiento de la arteria femoral para crear daño isquémico. La eficacia de las construcciones de IL-22-Fc se evalúan de forma similar a los procedimientos descritos previamente (Couffignal *et al.*, Am. J. Pathol. 152:1667 (1998); Takeshita *et al.*, Lab. Invest. 75:487 (1996); Isner *et al.*, Human Gene Therapy 7:959(1996)). Para ensayar la capacidad de un IL-22-Fc para modular una arteriopatía periférica, se usa el siguiente protocolo experimental: a) usando un roedor (como en el método anteriormente descrito), se liga un lado de la arteria femoral para crear daño isquémico a un músculo de la extremidad posterior (la otra extremidad no dañada actúa como el control); b) se suministra un polipéptido de IL-22-Fc (o fragmento del mismo) al animal por vía intravenosa y/o por vía intramuscular (en la extremidad dañada) al menos 3x por semana durante 2-3 semanas en un intervalo de dosificaciones; y c) el tejido muscular isquémico se recoge después a las 1, 2 y 3 semanas después del ligamiento para un análisis de biomarcadores e histología. En general, (como anteriormente) los parámetros para evaluación incluyen determinar la viabilidad y vascularización de tejido que rodea la isquemia, mientras que parámetros de evaluación específicos pueden incluir, por ejemplo, medir el flujo sanguíneo cutáneo, la temperatura de la piel y la inmunohistoquímica del factor VIII y/o reacción de fosfatasa alcalina endotelial. La expresión del polipéptido durante la isquemia se estudia usando cualquier técnica de hibridación in situ conocida en este campo. También se realiza biopsia en el otro lado del músculo normal de la extremidad posterior contralateral para análisis como un control.

Como alternativa, se usan otros modelos de ratón (Pownall *et al.* documento US 2011/0118173 A1). Existen varios modelos de ratón de aterosclerosis que se usarán para ensayar la ateroprotección. Estos incluyen el apo A-I KO, apo E KO, cistationina beta-sintasa y apolipoproteína E y el doble KO apo A-I/SR-BI. Estos modelos de ratón de aterosclerosis se tratan con IL-22-Fc mediante inyección, dosificación oral o tratamiento *ex vivo*. La medición de los niveles de colesterol en sangre después del tratamiento con IL-22-Fc mostrará una reducción inmediata del colesterol en plasma total y una cantidad aumentada de neo HDL y la aparición posterior de formas maduras de HDL, que contiene colesterol extraído de tejido periférico durante un periodo apropiado de horas.

#### **Ejemplo 9 - Efecto de IL-22 Fc recombinante en modelos de ratón diabéticos**

En los estudios iniciales de los inventores para estudiar el efecto de IL-22-Fc en síndromes metabólicos, se ha observado que los ratones IL-22R KO eran más susceptibles a obesidad inducida por dieta y resistencia a la insulina. En experimentos posteriores se observó una pérdida de grasa corporal después del tratamiento con IL-22-Fc recombinante. A la vista de estos datos se ha elegido ensayar el papel de IL-22-Fc recombinante en modelos de ratón alimentados y en ayunas. Los criterios de valoración de la eficacia tales como glucosa con alimentación y en ayunas, peso en ayunas y tolerancia a la glucosa y la insulina se evaluaron en este estudio.

Los ratones (10 animales/grupo) se trataron con IL-22-Fc recombinante o anticuerpo antiambrosía como un control de isotipo IgG, proporcionando 2 dosis/semana durante 3 semanas (Figura 19):

- Grupo 1: ratones *db/db* (BKS.Cg-Dock7(m)/+ Lepr<sup>db</sup>/J FAT): anticuerpo antiambrosía (50 µg)
- Grupo 2: ratones *db/db*: IL-22-Fc recombinante (50 µg)
- Grupo 3: Ratones con obesidad inducida por dieta (OID): anticuerpo antiambrosía (50 µg)
- Grupo 4: Ratones con obesidad inducida por dieta (OID): IL-22-Fc recombinante (50 µg)

Se obtuvieron hembras *db/db* de 12 semanas de edad de Jackson Laboratory y se usaron en el experimento. Antes del estudio los ratones se aclimataron (manipulación diaria) durante 7-10 días después de la llegada y se alojaron individualmente antes del inicio del experimento. Durante los días -5 al día -1 se recogió sangre (3-5  $\mu$ l) mediante corte de la cola para medición de glucosa de línea basal diariamente. El día 0 se administraron proteínas mediante inyección i.p. (150  $\mu$ l) en PBS, seguido de dos dosis diarias semanales durante 3 semanas. Se recogió sangre (3-5  $\mu$ l) de nuevo mediante corte en la cola para medición de glucosa el día 2, 4, 8, 10, 14, 18 y 21. Para medición de pK, se recogieron 30  $\mu$ l de sangre mediante sangrado orbital con anestesia los días 2, 7, 13 y 20.

Se administraron IL-22-Fc recombinante o anticuerpo de control de isotipo IgG dos veces a la semana a través de la vía intraperitoneal durante tres semanas. El peso corporal y la glucosa con alimentación se midieron cada 2 días hasta el final del estudio el día 23 y se realizaron mediciones de glucosa mediante corte de la cola y se midieron usando un glucómetro (Figuras 20A-B). Para acceder al nivel de glucosa con alimentación y en ayunas, el día 10 la medición de glucosa con alimentación se realizó por la mañana y los ratones de ambos grupos se mantuvieron en ayunas durante 4 horas (h) y se tomaron mediciones de glucosa usando un glucómetro (Figura 20C). La exposición a IL-22-Fc dio como resultado un efecto reductor de la glucosa significativo en ratones *db/db*.

Se realizó ensayo de tolerancia a la glucosa (ETG) después de 2 semanas de tratamiento con IL-22-Fc o control de IgG a 50  $\mu$ g/dosis dos veces a la semana. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante una noche (14 h). Se midió el nivel de glucosa en ayunas por la mañana y este actuó como una línea basal. El peso corporal se midió y se recogió sangre (3-5  $\mu$ l) mediante corte de la cola para medición de glucosa. Se administró por vía intraperitoneal solución de glucosa a 1,5 mg/kg de peso corporal y se tomó una medición de glucosa cada 30 min. Los valores de glucosa se representaron en el gráfico para 30, 120, 180 y 220 min. Se realizó un ETG más el día 21 después de ayuno durante una noche el día 20. Los ratones se pesaron diariamente. Todos los grupos se sacrificaron el día 23 y se recogieron tejidos para histología. El tratamiento con IL-22-Fc demostró mejora significativa en la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina (Figura 21).

Se realizó ensayo de tolerancia a la insulina (ETI) después del día 20 de los ratones tratados con IL-22-Fc o control de IgG a 50  $\mu$ g/dosis dos veces a la semana. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 h y se tomó el nivel de glucosa de línea basal. Se administraron 1 mU/kg de peso corporal por vía intraperitoneal y se supervisaron los niveles de glucosa en sangre mediante cortes de la cola cada 30 min. Para calcular el % de reducción de glucosa, el nivel de glucosa de línea basal después de 4 h en ayunas se normaliza a 100 %. Se mostró que el tratamiento con IL-22-Fc mejora significativamente la sensibilidad a insulina medida mediante ensayo de tolerancia a la insulina (Figuras 22A-B).

IL-22R se expresa en gran medida en páncreas especialmente en células de los acinos, aunque su estado de expresión en células de islotes  $\beta$  aún no está claro. Se examinó la señal de insulina en páncreas de IL-22 Fc o ratones *db/db* tratados con proteína de control. La evaluación histológica de los ratones diabéticos también se llevó a cabo para evaluar la expresión de insulina en las células de islotes y el nivel de esteatosis periportal hepática en animales tratados con IL-22-Fc. Se realizó inmunohistoquímica para insulina y glucagón en tejidos de páncreas incluidos en parafina fijados en formalina como se ha indicado previamente (Wu et al. 2011, Science translational medicine 3, 113ra126, doi:10.1126/scitranslmed.3002669) usando ant glucagón de conejo (Cell Signaling Technologies #2760) con anticuerpo secundario de cabra anticonejo conjugado con Alexa Fluor 555 o antiinsulina de cobaya (DAKO A0564) con anticuerpo secundario de cabra anticobaya conjugado con Alexa Fluor 647. El porcentaje de área de insulina por área de islote se calculó dividiendo el área positiva para insulina por el área de islote menos el área nuclear.

IL-22-Fc parece aumentar la expresión de insulina en islotes en ratones *db/db* (Figura 23A) y el análisis cuantitativo reveló un aumento significativo tanto de la intensidad de señal de insulina (Figura 23 B y Figura 24) como del área positiva para insulina en animales tratados con IL-22-Fc (Figuras 25), mientras que IL-22 Fc no aumentó la intensidad de señal de glucagón (Figura 23 C). El área positiva para insulina mostró un aumento de 2,16 veces con tratamiento de IL-22-Fc en comparación con el tratamiento con control de Herceptina (intervalo de confianza del 95 % de 1,25 a 3,72). El número y área de islote no se vieron afectados por el tratamiento con IL-22 Fc. No obstante el área de células  $\beta$  por islote y la intensidad de tinción de insulina de páncreas tratado con IL-22 Fc se elevó significativamente (Figuras 23 y 52).

Las células beta del páncreas de ratones obesos mostraron señales de desgranulación y degeneración (datos no mostrados). Se observó tinción de insulina mayor estadísticamente significativa en células beta de ratones obesos tratados con IL22, en comparación con ratones obesos no tratados (Figura 23A, B). El aumento se debió probablemente a almacenamiento de insulina aumentado en el grupo de tratamiento de IL22. A pesar del mayor nivel de insulina en páncreas visto en ratones obesos tratados con IL22, los niveles de insulina en suero en estos ratones se redujeron de hecho en comparación con ratones obesos sin tratamiento con IL22, en condición con alimentación o en ayunas (Figura 23D, E). No obstante los ratones obesos tratados con IL22 respondieron a la glucosa liberando insulina en un patrón más parecido a ratones de tipo silvestre en dieta de pienso, en comparación con ratones obesos no tratados (Figura 23F). Por lo tanto, IL22 mejoró la homeostasis de glucosa mejorada en ratones obesos potencialmente aumentando la granulación y mejorando el mecanismo de control de liberación de insulina en los ratones obesos.

A continuación, se examinó el efecto de IL-22 Fc en homeostasis de insulina. Se trataron ratones alimentados con DAG con IL-22 Fc dos veces por semana durante 8 semanas. Los resultados muestran que (Figura 23D y E). Los datos presentados en la Figura 23F muestran niveles de insulina en ratones 0 o 30 minutos después de la inyección de glucosa. Los ratones alimentados con DAG tratados con IL-22 Fc, pero no ratones con DAG de control, respondieron a la inyección de glucosa aumentando los niveles de insulina en suero, similar a ratones de tipo silvestre en dieta de pienso (dieta normal). Véase Figura 23F. Por lo tanto, IL-22 mejoró la homeostasis de la glucosa en ratones obesos y mejoró la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

Como comparación, se han estudiado ratones KO para el receptor de IL-22 y su susceptibilidad a obesidad inducida por dieta (OID) y resistencia a la insulina. El ratón IL-22 R KO se describe en la Figura 43 y a continuación. Se pusieron ratones KO para el receptor de IL-22 y ratones compañeros de camada de control en una dieta alta en grasa al 60 % desde la semana 7 de edad durante 10 semanas. Para evaluar la tolerancia a la glucosa inducida por dieta alta en grasas (DAG), los ratones se mantuvieron en ayunas durante una noche y se realizó un ensayo de tolerancia a la glucosa al día siguiente por la mañana. Para este experimento, se pusieron ratones IL-22 R KO de siete semanas de edad y animales compañeros de camada de control de la misma edad (WT: actuó como tipo silvestre) en una DAG al 60 % durante 10 semanas. Se inyectaron en los ratones por vía intraperitoneal 1,5 mg/kg de peso corporal de glucosa y niveles de glucosa en sangre se supervisaron cada 30 minutos durante un periodo de 2 h. El área bajo la curva total para ratones individuales se calculó y se representó gráficamente. Los datos demuestran que los niveles de glucosa son significativamente mayores en los ratones IL-22R KO basándose en el área total bajo la curva (Figura 27A-B), que sugiere que el receptor de IL-22 desempeña un papel en la tolerancia a la glucosa inducida por DAG. Los ratones KO para el receptor de IL-22 aumentaron de hecho de peso más después de alimentación con DAG en comparación con ratones de control WT compañeros de camada (Figura 28).

#### **Ejemplo 10 - Tratamiento con IL-22 de ratones propensos a la aterogenia (Ldlr<sup>-/-</sup>-Apobec1<sup>-/-</sup>), que da como resultado reducción de LPS en suero y LDL/HDL en suero**

Se inyectaron en ratones Ldlr<sup>-/-</sup>, Apobec1<sup>-/-</sup> (dco) de nueve meses de edad por vía intraperitoneal 50 ug de proteína de fusión de IL-22Fc o 50 µg de anticuerpo de control antiambrosía (n=6 por grupo). Cuarenta y ocho horas después, los animales se sacrificaron y se recogió el suero. Los perfiles lipídicos se analizaron usando ensayo de Cholestech LDX y se analizó la endotoxina usando el ensayo de lisado de amebocito de *Limulus*. Se redujo el LPS en suero en 50 % (p=0,0052) y se redujo LDL/HDL en suero en 30 % (p=0,049) con IL-22-Fc en comparación con anticuerpo de control Fc antiambrosía (Figura 29).

En resumen, los ratones tratados con proteína de fusión de IL-22 Fc tuvieron cambios positivos rápidos en el perfil lipídico y reducción en la endotoxina en circulación.

#### **Ejemplo 11 IL-22Fc aceleró el cierre de heridas en el modelo de curación de heridas diabéticas murino, por administración sistémica o tópica**

##### **Protocolo**

Las construcciones de IL-22 Fc fueron normalmente una proteína de fusión de IL-22 de ratón-IgG2a de ratón (SEQ ID NO: 72 y 73) como se muestra en las Figuras 32A-B.

Ratones usados en el estudio: se criaron ratones IL-22R KO y ratones de tipo silvestre (WT) compañeros de camada de control en la instalación animal de Genentech. Los ratones IL-22R KO se describen en la Figura 43 y a continuación. Se usaron los ratones hembra diabéticos de 9 semanas de edad BKS.Cg-Dock7(m)<sup>+/+</sup> Lepr(db)/J FAT (db/db) y BKS.Cg-Dock7(m)<sup>+/-</sup> Lepr(db)/J delgados (BKS de control). Los ratones se seleccionaron aleatoriamente en el estudio basándose en el peso corporal y el nivel de glucosa con alimentación.

El protocolo de curación de heridas se siguió estrictamente según las directrices de cirugía de supervivencia de roedores de IACUC. Se usó técnica estéril durante todo el procedimiento (incluyendo guantes estériles, máscara, bata y paño quirúrgico). Después de la inducción de un plano quirúrgico de anestesia, se afeitó la parte dorsal de la espalda de los animales (del área escapular al área lumbar), se retiró el pelo restante con loción depiladora (Nair o equivalente), seguido de lavado con agua estéril y se preparó con limpieza con betadine seguido de lavado con alcohol. El animal se colocó en posición decúbito ventral y después se usó un sacabocados de 6 mm para marcar el área de piel para retirar (con marcador estéril en la punta del sacabocados, y después en contacto con la piel). Se realizó una herida cutánea de grosor completo de 6 mm de diámetro 1 cm a la izquierda y la derecha de la línea media. El pericondrio subyacente se retiró con elevador perióstico unas tijeras finas.

Después de esto se colocó un marco de silicona de 0,5 mm de grosor, 10-12 mm de diámetro interno, alrededor de la herida circular con pegamento rápido). Después se colocó un cuadrado de 2 cm de adhesivo Tegaderm™ (3M, St. Paul, MN) o Opsite® (Smith & Nephew, Inc., St. Petersburg, FL) sobre la herida y el marco y se permitió que el animal se recuperara de la anestesia.

Se retiraron los apósitos Opsite® cada dos días, se inspeccionaron las heridas, se aplicaron tratamientos por vía

tópica (20 µl de material de ensayo o solución salina) y se aplicó apósito nuevo. El hueco de herida se calculó midiendo el diámetro de la herida desde el día 0 hasta el final del estudio.

En algunos estudios se registró el nivel de glucosa con alimentación después de corte de la cola y usando el glucómetro comercial Onetouch® (lifeScan, Inc., Milpitas, CA).

## Resultados

### Los ratones IL-22R-/- mostraron defectos en la respuesta de curación de heridas dérmicas

Se estudió el papel de la señalización de IL-22 en la respuesta de curación de heridas dérmicas en IL-22R KO (que carecían de señalización de IL-22 y los miembros de su familia IL-20 e IL-24). La Figura 33 muestra la curva de hueco de herida tanto de ratones IL-22RKO (n=10) como de ratones de control IL-22RWT (n=10) durante 14 días. Se generó un diámetro de 6 mm de diámetro en día 0 y el hueco se midió cada 2 días comenzando desde el día 4. El hueco de herida de ratones IL-22R KO mostró retardo significativo en el cierre en comparación con el control compañero de camada WT del día 8 al día 14. Al final del estudio (día 14) el 100 % de las heridas de ratones WT estaban cerradas, en comparación con solamente el 30 % de ratones en los ratones IL-22RKO (p=0,005). Las diferencias en el hueco de herida entre IL-22RKO y ratones de control WT se consideran estadísticamente significativas a  $P \leq 0,05$ .

### Defecto de la curación de heridas en ratones diabéticos obesos

La respuesta de curación de heridas dérmicas en la condición diabética se modeló en el estudio preclínico usando ratones diabéticos KO para el receptor de leptina (BKS.Cg-Dock7(m)/+ Lepr(db)/J FAT) (db/db) y ratones delgados de control WT. Se generaron heridas circulares (6 mm) en la espalda de un ratón y se registró el cierre de hueco de herida cada 2 días comenzando desde el día 4. La Figura 34 muestra el cierre de hueco de herida (en mm) medido desde el día 0 hasta el día 27. A lo largo del periodo de estudio, las heridas de ratones db/db obesos, diabéticos, presentaron retardo estadísticamente ( $P \leq 0,0001$ ) significativo en el cierre de herida en comparación con ratones delgados. El día 14, el 100 % de las heridas de ratones WT estaban cerradas mientras que ninguna de la heridas de ratones db/db están cerradas incluso el día 27 (Figura 35A). Se indujo expresión de IL-22 como se midió por los niveles de ARN en ratones de tipo silvestre días después de la escisión de la herida, pero no en ratones db/db. Véase Figura 35B,

### Cierre de heridas acelerado por IL-22Fc en el modelo de curación de heridas diabéticas

Como los ratones IL-22R-/- presentan defectos en el cierre de heridas, se planteó la hipótesis de que IL-22 puede influir en el cierre de heridas. La Figura 36 mostró el diagrama esquemático del diseño de estudio. Se usaron ratones db/db obesos hembra de 9 semanas de edad para modelar la curación de heridas diabéticas. Además de IL-22Fc (murino), se usaron anticuerpo antiambrosía como proteína de control de Fc y anticuerpo anti FGFR1 como control positivo. Ya que se ha demostrado que el anticuerpo anti FGFR1 normaliza el nivel de glucosa en sangre en este modelo preclínico, se usó como un anticuerpo de control. La Figura 36 muestra el diagrama esquemático del diseño de estudio. Los grupos de tratamiento fueron:

- Anticuerpo antiambrosía (50 µg/dosis intraperitoneal (i.p.), 8 dosis)
- IL-22Fc (50 µg/dosis intraperitoneal (i.p.), 8 dosis)
- Anticuerpo anti-FGFR1 (0,5 mg/kg intraperitoneal (ip) el día 0 y el día 14).

Tanto IL-22Fc como anti FGFR1 mostraron un efecto estadísticamente significativo ( $P \leq 0,001$ ) en la reducción del nivel de glucosa en sangre en los ratones diabéticos en comparación con tratamiento antiambrosía (Figura 37). Los datos (Figura 38) muestran que la administración sistémica de IL-22 Fc tuvo un efecto notable en la tasa de cierre de heridas en comparación con tratamiento con anticuerpo antiambrosía de control. Las diferencias en el hueco de herida fueron significativas comenzando el día 16 ( $P \leq 0,05$ ) y las heridas en ratones tratados con IL-22Fc se habían cubierto completamente el día 27. Los ratones tratados con anticuerpo de control de Fc así como anti FGFR1 no consiguieron cerrar las heridas completamente incluso el día 27. La Figura 39 muestra las mediciones de huecos de heridas de ratones individuales el día 19, 21 y 27 donde las diferencias en el hueco de herida entre grupos tratados con IL-22 Fc en comparación con otros 2 grupos son muy significativas estadísticamente ( $P \leq 0,001$ ).

### Comparación del tratamiento con IL-22 Fc tópico frente a sistémico

La Figura 40 muestra el diagrama esquemático del diseño de estudio. En este estudio se compararon 2 modos de tratamiento - tratamiento tópico frente a sistémico. Los grupos fueron:

- Anticuerpo antiambrosía (50 µg/dosis tópica, 8 dosis)
- IL-22Fc (50 µg/dosis tópica, 8 dosis)
- IL-22Fc (50 µg/dosis intraperitoneal (i.p.), 8 dosis).

El gráfico en la Figura 41 muestra que la administración tópica de IL-22-Fc así como sistémica de IL-22-Fc aceleró el cierre de heridas en comparación con el tratamiento de anticuerpo de control. Las mediciones de hueco de herida fueron estadísticamente significativamente ( $P \leq 0,001$ ) diferentes del día 16 al día 22. No se observó ninguna diferencia significativa con la tasa de cierre de heridas entre 11-22 grupos de tratamiento tópico y sistémico de Fc. Véase también Figura 42.

## Ejemplo 12 Los ratones obesos mostraron inducción de IL-22 reducida

En los siguientes experimentos, la regulación de IL-22 durante las respuestas inmunitarias se examinó en ratones obesos. Las principales fuentes de leucocitos de IL-22 son células linfoides innatas (CLI) y subconjuntos de T auxiliares, especialmente linfocitos Th17 y Th22. Se examinó la producción de IL-22 de linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras exposición a antígeno en ratones *db/db* deficientes en receptores de leptina.

### Protocolo

**Tratamiento *in vivo* con OVA y flagelina.** Para activar linfocitos T CD4 *in vivo*, se inyectaron 100 µg de OVA emulsionada en adyuvante completo de Freund (CFA) por vía subcutánea en la parte inferior de la espalda de los animales y los ganglios linfáticos inguinales se recogieron el día 7. Para activar TLR5, se inyectaron 3 µg de flagelina ultrapura (InvivoGen) por vía intravenosa y se recogieron muestras de suero a las 2 h.

**Ratones.** Los ratones deficientes en receptor de leptina (*db/db*; BKS.Cg-*Dock7*<sup>m+/+</sup> *Lepr*<sup>db/J</sup> o B6.BKS(D)-*Lepr*<sup>db/J</sup>), Los receptores deficientes en leptina (*ob/ob*; B6.Cg-*Lep*<sup>ob/J</sup>), y sus ratones de control delgados respectivos, así como ratones con dieta alta en grasa (C57BL/6J OID al 60 %) y los ratones de control con dieta de pienso se obtuvieron de Jackson Laboratory. Los ratones deficientes en IL-22 (Zheng *et al.*, 2007, Nature 445, 648-651) y ratones deficientes en IL-22Rα1 (descritos en la Figura 43 y posteriormente) fueron generados por Lexicon Pharmaceuticals y se retrocruzaron con cepa C57BL/6 más de 10 veces. Cuando se indique, los ratones se alimentaron con dieta de calorías ajustadas (DAG, que contenían grasa 60 %, Harlan) comenzando a la edad de 4-6 semanas de edad. Para estudios de metabolismo se usaron ratones de 12-18 semanas de edad, mientras que se usaron ratones de 5-6 semanas de edad para estudios de infección de *C. rodentium*. Todos los experimentos animales fueron aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de los animales de Genentech.

**Purificación y diferenciación de linfocitos T CD4 sin tratamiento previo.** Los linfocitos T CD4 sin tratamiento previo se clasificaron y estimularon como se ha descrito previamente (Rutz, *et al.* 2011, Nature Immunol. 12:1238-45) y se cultivaron en condiciones específicas para cada subconjunto de forma similar al modo en que se ha descrito previamente. Misma referencia. Para inducción de IL-22, se usaron anti-IL-4 (10 µg/ml), anti-IFN-γ (10 µg/ml), e IL-6 recombinante (20 ng/ml); cuando se indique, se añadió leptina de ratón recombinante (1 µg/ml, R&D systems).

**Tinción intracelular y ELISA de IL-22.** Los linfocitos purificados de ganglios linfáticos se tiñeron con respecto a IL-22 e IL-17A como se ha descrito previamente (Zheng *et al.*, mencionado anteriormente) usando ficoeritrina (PE)-anti-IL-22 (1H8PWSR, eBioscience) e isotiocianato de fluoresceína (FITC)-anti-IL-17A (17B7, eBioscience). Se realizó ELISA de IL-22 como se ha descrito previamente (Zheng *et al.*, mencionado anteriormente) usando anticuerpos monoclonales anti-IL-22 (20E5 y 14B7, Genentech).

**Aislamiento de ARN y PCR en tiempo real.** Se recogió y procesó el colon y se aisló ARN con el minikit plus RNeasy (Qiagen). El nivel de ARNm de *Il22*, *Il22ra1* y *Reg3b* se evaluó usando análisis por PCR en tiempo real como se ha indicado previamente (Ota *et al.* 2011, Nature immunol. 12, 941-948). Los resultados se normalizaron con respecto a los del gen constitutivo de control *Rpl19* (que codifica la proteína ribosómica L19) y se indican como 2<sup>ΔCT</sup>. La secuencia de cebador y sonda para *Il22* y *Reg3b* se ha indicado previamente. Misma referencia. Para *Il22ra1*, se usaron 5'-AGG TCC ATT CAG ATG CTG GT-3' (SEQ ID NO: 74), 5'-TAG GTG TGG TTG ACG TGG AG-3' (SEQ ID NO: 75) y 5-FAM-CCA CCC CAC ACT CAC ACC GG-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 76).

**Análisis estadístico** Todo el análisis estadístico se realizó con el ensayo de t de Student para muestras no relacionadas de dos colas. El valor *p* menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

### Resultados

Después de inmunizar los ratones con ovoalbúmina (OVA) en adyuvante completo de Freund (CFA), los linfocitos T CD4 que expresaban IL-22 se detectaron *ex vivo* con tinción de citocina intracelular. Los linfocitos T IL-22<sup>+</sup> se redujeron significativamente en ratones *db/db* (Figuras 44A-B). De forma coherente con informes previos, los linfocitos T CD4 IL-17<sup>+</sup> también se redujeron significativamente en ratones *db/db* (Figura 45A). Se observaron resultados similares también en ratones *ob/ob* deficientes en leptina (Figura 45B). La leptina puede regular linfocitos Th, tales como linfocitos Th1 y linfocitos Treg. Sin embargo, no se observó un efecto directo de la leptina en la producción de IL-22 de linfocitos Th22 diferenciados *in vitro* (Figura 45C). Además, también se observó reducción similar de linfocitos T productores de IL-22 en C57BL/6 con OID (obesidad inducida por dieta o alimentados con DAG) inmunizados (Figuras 44C y D), lo que sugiere que la obesidad pero no falta de señalización de leptina podría ser responsable de la producción de IL-22 reducida en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La ruta de TLR5 de activación por flagelina

podría estimular la producción de IL-22 a partir de ILC.

En ratones *db/db* (Figura 44E), los ratones *ob/ob* (Figura 45E) y ratones con OID (Figura 44F), el nivel de IL-22 en suero fue significativamente menor que el de ratones WT tras exposición *in vivo* a flagelina. De forma coherente con los resultados de linfocitos T, la leptina en sí misma no potenció la producción de IL-22 de ILC *in vitro* (Figura 45D). En conjunto, estos datos sugirieron que hay un defecto general en la inducción de IL-22 tanto de ILC como de linfocitos T en ratones obesos.

### **Ejemplo 13 La defensa mucosa se vio comprometida en ratones deficientes en leptina y fue restaurada por la proteína de fusión de IL-22 Fc**

La IL-22 producida por ILC y linfocitos T es esencial para defensa del hospedador contra infección por *Citrobacter rodentium* en colon. Se analizó la inducción de IL-22 en el colon de ratones *db/db* y *ob/ob* infectados con *C. rodentium*. Se cultivó *C. rodentium* durante una noche y se inocularon a los ratones por vía oral  $2 \times 10^9$  UFC de bacterias como se describe (Zheng *et al.* 2008, Nature medicine 14, 282-289, doi:10.1038/nm1720). La carga bacteriana se analizó de la siguiente manera: se recogieron el bazo e hígado de ratones infectados, se pesaron y se homogeneizaron en NP40/PBS 0,1 % en tubo C con gentleMACS (Miltenyi Biotec). Los homogeneizados diluidos en serie se sembraron en placas en agar MacConkey (Remel) y se identificaron colonias de *C. rodentium* como colonias rosas después de incubación durante una noche a 37 °C. Cuando se indicó, los ratones se inyectaron por vía intramuscular con IL-22-Fc (150 µg/dosis) o cantidad equivalente de control de isotipo de ratón 3 veces por semana. Se realizó análisis de histología de colon de ratones infectados con *C. rodentium* como se ha indicado previamente (Ota *et al.* 2011, Nature immunology 12, 941-948, doi:10.1038/ni.2089), y se puntuaron con respecto a cambios epiteliales (proliferación, vesiculación, desprendimiento de enterocitos), inflamación y engrosamiento de la mucosa. Las puntuaciones clínicas se determinaron para cuatro regiones anatómicas - colon próximo, medio y distal y recto - en una escala de 0-5 con 0 = colon normal y 5 = enfermedad grave. Las puntuaciones regionales se sumaron para obtener una puntuación de gravedad de enfermedad de colon final para cada animal.

Corroborando los resultados anteriores, la inducción pico de IL-22 el día 4 en el colon en ratones *db/db* y *ob/ob* también se redujo significativamente, pero no se anuló completamente (Figura 46A). En ratones *db/db* después de inocularse por vía oral con *C. rodentium* no hubo ninguna pérdida de peso significativa (Figura 46B). Sorprendentemente, los ratones *db/db* infectados comenzaron a morir 10 días después de inoculación bacteriana y aproximadamente 60 % a 100 % de ratones *db/db* murieron durante la segunda semana de la infección en experimentos repetidos (Figura 46C). El análisis histológico de las secciones de colon de ratones *db/db* reveló aumento de la infiltración de células inflamatorias y daños epiteliales graves, incluyendo desprendimiento epitelial en la superficie de la mucosa (Figuras 46D-F). Además, estos ratones mostraron edema submucoso irregular y colonias bacterianas multifocales, que con frecuencia se asociaron con necrosis localizada. También se detectaron cargas bacterianas significativamente elevadas tanto en el hígado como en el bazo de ratones *db/db* (Figuras 46G-H). Se observaron también defectos similares en defensa de la mucosa en ratones *ob/ob* (Figura 54). Se esperaba que los ratones *db/db* tuvieran dicho defecto significativo en el control de la infección por *C. rodentium*; especialmente dado que la inducción de IL-22 por infección de *C. rodentium* solo era parcialmente defectuosa en estos ratones (véase Figura 46A).

Se ha indicado que los ratones deficientes en leptina también tienen defectos en las funciones de linfocitos B y se requiere anticuerpo contra *C. rodentium* para eliminar con el tiempo las bacterias del hospedador durante la fase tardía de la infección. Se examinó por lo tanto la producción de anticuerpo anti *C. rodentium* en estos ratones. Las muestras de suero se recogieron tomando sangre de la vena submandibular el día 10 después de la infección. La placa de ELISA se recubrió con *C. rodentium* destruida por calor o con un anticuerpo de captura de cabra anti Ig de ratón. La placa recubierta se lavó con tampón de lavado (Tween 20 0,05 % en PBS), se bloqueó durante 2 h con tampón bloqueo (BSA 0,5 %, Proclin 15 ppm en PBS) y se lavó antes de la adición de IgG monoclonal de ratón convencional diluido en serie (SouthernBiotech) o muestras de suero. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó y la Ig se detectó con IgG de cabra antirratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (SouthernBiotech), diluido 1/4.000 en diluyente de ensayo (BSA 0,5 %, Tween 20 0,05 %, Proclin 15 ppm en PBS), y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadió sustrato de peroxidasa TMB (Sigma-Aldrich) a cada pocillo. La absorbancia se leyó a 650 nm en lector de placas (Molecular Devices).

El título de anticuerpo IgG anti *C. rodentium* se redujo significativamente en los ratones *db/db* el día 14 después de la infección (Figura 46I). Sin embargo, la producción de IgG anti *C. rodentium* reducida sola no debería dar como resultado también la mortalidad temprana observada, ya que los ratones deficientes en Rag2, que carecen completamente de linfocitos B y producción de anticuerpos, pueden sobrevivir mucho más tiempo después de la infección (Zheng *et al.* 2008, Nature medicine 14, 282-289). Por lo tanto, el fracaso de la defensa del hospedador contra *C. rodentium* en ratones *db/db* fue provocado probablemente por defectos tanto en la respuesta de anticuerpos adaptativa como la inducción de IL-22 de ILC. A continuación, se llevó a cabo un experimento para examinar si IL-22 era capaz de restaurar la inmunidad de la mucosa en ratones *db/db* durante la infección por *C. rodentium* con la administración de IL-22-Fc exógeno. Como se muestra en la Figura 46J, aunque la mayoría de los ratones *db/db* tratados con IgG de control murieron, casi todos los ratones *db/db* tratados con IL-22 Fc sobrevivieron

a la infección (Figura 46J), lo que apoya que IL-22 Fc era capaz de restaurar terapéuticamente los defectos inmunitarios de la mucosa en ratones *db/db*.

#### **Ejemplo 14 IL-22 Fc redujo los niveles de glucosa en ratones obesos y ratones normales alimentados con dieta alta en grasas**

Como se ha descrito en el Ejemplo 9 anterior, IL-22 Fc redujo los niveles de glucosa en ratones *db/db* que ya habían desarrollado hiperglucemia (Figura 20A). El beneficio terapéutico fue constante durante el transcurso de la administración de IL-22-Fc. Después de 3 semanas de tratamiento, el nivel de glucosa en estos ratones descendió por debajo de 200 mg/dl, cercano al nivel de glucosa normal en ratones WT, aunque los ratones *db/db* tratados con proteína de control mantuvieron su nivel de glucosa alto. La reducción de glucosa en ratones tratados con IL-22 Fc fue más evidente cuando los ratones se mantuvieron en ayunas (Figura 20C). El tratamiento con IL-22 Fc también dio como resultado una tendencia de pérdida de peso o retardó el aumento de peso en comparación con el tratamiento de control. Sin embargo, al final de este estudio, la diferencia de peso entre los dos grupos no alcanzó significación estadística en estos ratones (Figura 20B). Corroborando con estos datos, el tratamiento con IL-22 Fc condujo a tolerancia a la glucosa significativamente mejora y sensibilidad a la insulina en ensayo de tolerancia a la glucosa y ensayo de tolerancia a la insulina (Figura 21 y Figura 22, respectivamente).

Para confirmar las funciones beneficiosas generales de IL-22 exógeno en la modulación de trastornos metabólicos, se administró IL-22 Fc durante 4 semanas a ratones C57BL/6 que se habían alimentado con DAG durante al menos 8 semanas para inducir intolerancia a la glucosa. Para el ensayo de tolerancia a la glucosa (ETG), los ratones se mantuvieron en ayunas durante una noche y se inyectaron i.p. con solución de glucosa a 1,5 mg/kg. Para el ensayo de tolerancia a la insulina (ETI), los ratones se inyectaron i.p. con solución de insulina a 1,0 unidad/kg. Se midió la glucosa en sangre antes y después de la inyección. La glucosa en sangre se midió por Contour (Bayer).

De forma coherente con los resultados de ratones *db/db*, el tratamiento con IL-22 Fc redujo significativamente el nivel de glucosa en suero, especialmente después del ayuno (Figura 47A). También hubo una reducción del peso corporal (o aumento del peso retardado) en el grupo tratado con IL-22 Fc al final del estudio (Figura 47B). Además, IL-22 Fc redujo la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ratones C57BL/6 alimentados con DAG (Figuras 47C y D). Se obtuvieron resultados similares cuando los ratones se administraron simultáneamente con IL-22 fc al comienzo de la alimentación con DAG (Figura 48). En conjunto, los datos demostraron que IL-22 Fc fue una terapia potencial para normalizar la concentración de glucosa en suero y aliviar la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ratones obesos.

#### **Ejemplo 15 IL-22 Fc redujo el consumo de alimento y aumentó la expresión de PYY en ratones obesos y alimentados con DAG**

La reducción del consumo de alimento podría invertir la hiperglucemia y la resistencia a la insulina en ratones diabéticos. De hecho, los ratones *db/db* tratados con IL-22 Fc mostraron reducción significativa del consumo de alimento en comparación con el grupo de control (Figura 49A). Se realizaron experimentos de alimentación en paralelo para asegurar los mismos consumos de alimento en los ratones tratados con IL-22 Fc y control (Figura 50). El consumo de alimento se midió para el grupo alimentado a voluntad diariamente durante el estudio. El alimento proporcionado para grupos alimentados en paralelo se restringió al mismo consumo de alimento del día anterior del grupo alimentado a voluntad. De forma correspondiente, el tratamiento y la medición del grupo alimentado en paralelo fue un día después del grupo alimentado a voluntad.

Incluso en estas condiciones, IL-22 Fc redujo significativamente la glucosa en suero aunque en un punto temporal posterior (Figura 49B) e invirtió la tolerancia a la glucosa en ratones *db/db* (Figura 49C), lo que sugiere que la modulación del consumo de alimento por IL-22 no era el único mecanismo para su efecto terapéutico en enfermedad metabólica. Se observaron resultados similares en ratones alimentados con DAG (datos no mostrados). Para entender mejor cómo IL-22 reguló el consumo de alimentos y el metabolismo, se examinó la expresión de hormonas intestinales, PYY, que se sabe que inhiben el consumo de alimento.

Se inyectó a los ratones i.p. 50 µg de IL-22-Fc el día 0 y 2. El día 4 los ratones se mantuvieron en ayunas durante una noche y se volvieron a alimentar durante 1 h el día 5. Se recogieron muestras de sangre el día 2 antes del tratamiento y el día 5 después de la alimentación. Todas las muestras de suero se mezclaron con inhibidor de proteasa (Sigma), inhibidor de DPPIV (Millipore) y Pefabloc (Roche) inmediatamente después de la recogida. Se midió PYY con el kit de ELISA de PYY (Abnova) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados muestran que el tratamiento con IL-22 Fc aumentaron significativamente la concentración de PYY en el suero de ratones *db/db* y alimentados con DAG (Figuras 49D y E). Para demostrar que el efecto de IL22 en el consumo de alimento estaba mediado a través de la promoción de la producción de PYY, se examinó el consumo de alimento en ratones tratados con el inhibidor de PYY BIIE0246. Los ratones C57BL/6 con dieta normal no estaban tratados o se trataron con IL-22 Fc el día 2 y día 4. Después de ayuno durante una noche, se midió el consumo de alimento durante una alimentación de 4 horas. Los resultados muestran que la reducción del consumo de alimento en ratones tratados con IL-22 Fc se invirtió por BIIE0246 (datos no mostrados), lo que indica que el efecto de IL-22 Fc en el consumo de alimento reducido estaba mediado a través de la inducción de PYY.

### Ejemplo 16 IL-22 Fc redujo LPS en suero y ALT y AST en hígado y aumentó el metabolismo de lípidos aumentado en ratones obesos

Ya que el receptor de IL-22 se expresa en muchos órganos incluyendo hígado y páncreas que regulan el metabolismo, los beneficios terapéuticos de IL-22 en enfermedades metabólicas probablemente estén mediados por diversos mecanismos. La endotoxemia metabólica contribuye al estado inflamatorio y la resistencia a la insulina y la modulación de la microbiota intestinal potencian la tolerancia a la glucosa. Se midió la endotoxina en suero mediante el kit de ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*, QCL-1000 (Lonza), siguiendo las instrucciones del fabricante. ALT y AST se midieron por Cholestech LDX (Alere). Los resultados mostrados en la Figura 49F demuestran que el tratamiento con IL-22 Fc dio como resultado reducción significativa de la cantidad de LPS en el suero de ratones *db/db*.

IL-22 puede reprimir los genes implicados en la lipogénesis y aliviar la esteatosis hepática. Se examinaron a continuación los niveles de ALT y AST en suero. La glucosa en sangre se midió por Contour (Bayer). ALT y AST se midieron por Cholestech LDX (Alere). Como se muestra en las Figuras 51A y B, el tratamiento con IL-22 Fc redujo los niveles de ALT y AST en el suero en ratones *db/db* (Figura 51A) y alimentados con DAG (Figura 51B). La grasa abdominal también se redujo significativamente con el tratamiento de IL-22-Fc ratones alimentados con DAG (Figura 51C). Además, se indujeron genes responsables del metabolismo de lípidos por IL-22 en adipocitos primarios (Figura 51D). A continuación, se examinó el efecto de IL-22 en triglicéridos y colesterol en hígado y tejido adiposo. Los resultados muestran que IL-22 Fc redujo los triglicéridos, el colesterol y ácidos grasos libres (FFA) (Figura 51E), así como triglicéridos hepáticos (Figura 51F), colesterol hepático (Figura 51G) y triglicéridos en tejido adiposo blanco (Figura 51H) en ratones alimentados con DAG. De forma similar, IL-22 redujo los triglicéridos en el hígado y el tejido adiposo blanco en ratones *db/db* (Figura 51I y Figura 51J). Experimentos adicionales muestran que el tratamiento con IL-22 Fc redujo las citocinas inflamatorias tales como TNF $\alpha$  e IL-1  $\beta$  en comparación con ausencia de tratamiento en ratones obesos (datos no mostrados). La tinción con H y E de secciones de hígado reveló una reducción en la esteatosis periportal hepática con tratamiento de proteína de fusión de IL-22 Fc (Figura 26).

IL-22 señala a través de cadenas de IL-22R1 e IL-10R2. IL-22R1 también puede emparejarse con cadena de IL-20R2 y puede utilizarse mediante IL-20 e IL-24. Se ha mostrado que todos estos ligandos indujeron efectos biológicos corriente abajo muy similares a la epidermis cutánea (Sa *et al.*, 2007, J Immunol 178, 2229-2240). Por lo tanto, los ratones deficientes tanto en IL-22 como en IL-22R1 se examinaron para evitar la redundancia potencial de otras citocinas en diabetes inducida por DAG. La generación de ratones nuligénicos para IL-22R se ilustra en la Figura 43A. La supresión de IL-22R1 en los ratones KO se confirmó por la ausencia de ARNm de IL-22R1 en los ratones IL-22R KO y la falta de expresión de ARNm de RegIIIb en respuesta a IL-22 Fc en los ratones IL-22R KO. Véase Figuras 43B y C. Además, la administración de IL-22-Fc a ratones IL-22R KO no indujo pStat3 (datos no mostrados).

No se observó ninguna diferencia en la tolerancia a la glucosa y el peso corporal en ratones deficientes en IL-22 con respecto a los de controles compañeros de camada WT (Figura 53). Cuando se trataron ratones deficientes en IL-22R1 con dietas altas en grasas durante tres meses, sin embargo, estos ratones desarrollaron tolerancia a la glucosa significativamente más grave y aumentaron más de peso (Figuras 49G, H e I), lo que apoya un papel crítico de la ruta de IL-22R en el control del metabolismo. Se examinó la posibilidad de la redundancia de IL-20 e IL-24 en la reducción del síndrome metabólico. En este experimento, se trataron ratones *db/db* con IL-20 Fc, IL-22 Fc o IL-24 Fc. El resultado indica que solamente IL-22 Fc redujo el nivel de glucosa en suero (Figura 55B) y mejoró la tolerancia a la glucosa en un ensayo de ETG el día 20 (Figura 55C) en ratones *db/db*, mientras que el tratamiento de ratones *db/db* con IL-20 Fc o IL-24 Fc no. La reducción del peso corporal no fue estadísticamente significativa. Experimentos adicionales muestran que aunque IL-20 Fc e IL-24 indujeron pStat3 en adipocitos primarios, estas citocinas no consiguieron inducir pStat3 en tejido hepático de ratones *db/db* que se habían hecho insensible a la insulina (datos no mostrados). El tratamiento de IL-22 Fc en los ratones IL-22R KO no tuvo ningún efecto en un ensayo de tolerancia a la glucosa, lo que confirma que el efecto de IL-22 Fc se ejerció a través de la señalización de IL-22 R (datos no mostrados).

Los estudios presentados aquí indican funciones críticas de IL-22 en la regulación de procesos metabólicos. Los ratones deficientes en IL-22R1 estaban predispuestos al desarrollo de síndromes metabólicos. IL-22 exógena no era solamente capaz de restaurar los defectos inmunitarios de la mucosa en modelos diabéticos preclínicos, sino que además ayudó a normalizar los metabolismos de la glucosa y lípidos. IL-22, por lo tanto, puede proporcionar un nuevo enfoque terapéutico para tratar trastornos metabólicos humanos.

### Ejemplo 17 Comparación de VEGF e IL-22 en la promoción de la curación de heridas en ratones *db/db*

En este experimento, el efecto de IL-22 en la promoción o mejora de la curación de heridas se analizó y comparó con el de VEGF. Se obtuvieron ratones hembra BKS.Cg-*Dock7<sup>tm</sup>* +/- *Lepr<sup>db</sup>*/J *db/db* de 11 semanas de edad de Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Todos los estudios animales experimentales se realizaron con la aprobación de los comités de cuidado y uso de animales institucional de Genentech Lab Animal Research. Con anestesia de isoflurano la piel dorsal se afeitó y después se aplicó crema depilatoria para retirar el pelo restante. Después limpiar la piel y prepararla con povidona-yodo seguido de hisopos con alcohol, se creó una herida circular, de grosor

completo, en la piel dorsal de cada ratón usando un sacabocados de 6 mm desechable (Miltex, Inc.). La herida se cubrió con una película de Tegaderm antes y después del tratamiento.

Los resultados en la Figura 56 muestran que VEGF parecía conseguir un cierre de superficie más rápido en comparación con IL-22; sin embargo, cuando se examinó el lado de la dermis de la piel, las heridas tratadas con VEGF permanecieron abiertas incluso el día 21 (Figura 56B). También se analizó la capacidad de VEGF e IL-22 Fc en la promoción de la angiogénesis en el sitio de herida. En este experimento, se escindieron dos heridas de 6 mm en ratones *db/db* el día 0. El día 2, 4, 6, 8, 10 y 12, se administró por vía tópica a las heridas anticuerpo antiambrosía de control o IL-22 Fc (50 µg) o VEGF (20 µg) en solución salina por vía tópica a las heridas. El día 6 y 12, se retiraron tres ratones de cada grupo para análisis de histología e inmunohistoquímica y tinción con BrdU. El día 16, se retiró un ratón para tinción con BrdU. El día 18, 20 y 22, se retiró un ratón de cada grupo para cada punto temporal para análisis de inmunohistoquímica y tinción de tejido completo de CD31. Los resultados indican que tanto VEGF como IL22-Fc, pero no el anticuerpo antiambrosía de control, promovieron la formación de vasos sanguíneos en el sitio de herida como se analizó mediante inmunotinción de tejido de CD31 (datos no mostrados).

A continuación, se analizó la expresión de citocinas y quimiocinas inducida por IL-22 e inducida por otro miembro de la familia de IL-10 en epidermis reconstituida. La epidermis reconstituida fue modelos tisulares EpiDerm RHE mantenidos en medio EPI-100-NMM obtenido de MatTek. Véase Sa *et al.* 2007, J. Immunol. 178:2229-2240. Los resultados muestran que IL-22 indujo prominentemente la expresión de IL-8, CXCL-1, MIP 3a, DMC y MCP-1 epidermis humana reconstituida, aunque también se observaron inducciones por IL-19, IL-20 o IL-24 (Figura 57). A la vista del efecto de IL-22 en la curación de heridas descrita en el presente documento, IL-19, IL-20 e IL-24 también pueden desempeñar un papel en la aceleración de la curación de heridas.

#### **Ejemplo 18 IL-22 proporciona eficacia superior en el tratamiento de herida infectada que VEGF y PDGF en un modelo de herida entablillada en ratones *db/db***

En el modelo de curación de heridas de ratón, la contracción representa una gran parte del cierre de heridas en ratones debido a que la piel de los ratones es móvil. Para asemejarlo más estrechamente al proceso de curación de heridas en el ser humano, se estableció un modelo de herida entablillada de ratón en que se pegó un anillo de sílice a la piel y se ancló con suturas alrededor de la herida para evitar la contracción local de la piel (véase imágenes representativas en la Figura 59B). Véase, por ejemplo, Zhao *et al.*, 2012, Wound Rep. Reg. 20:342-352 y Brubaker *et al.*, 2013, J. Immunol., 190:1746-57. En este modelo, las heridas se curaron mediante procesos de granulación y reepitelización, similares a los procesos de curación de heridas en seres humanos. Para entablillar la herida, se aplicó pegamento Krazy (Elmer's Products, Inc.) a un lado de la férula de silicona estéril (Grace Bio-Labs, Inc.) y la férula se colocó cuidadosamente alrededor de la herida con el lado del pegamento hacia abajo de modo que la herida estuviera centrada en la férula. El pegamento se unió a la piel al contacto y actuó como una férula durante el transcurso del estudio completo. La férula se ancló adicionalmente a la piel con cuatro suturas de nailon de monofilamento de 6,0 interrumpido (Ethicon, Inc.). Se tomó una imagen digital de la herida antes de cubrirse la herida con una película transparente de Tegaderm. Además, la infección microbiana en la herida abierta puede retardar la curación de heridas, y las heridas crónicas, tales como heridas crónicas observadas en pacientes diabéticos, son con frecuencia heridas infectadas.

Usando el modelo de herida entablillada, se examinó el efecto de IL-22 Fc en la herida infectada en ratones *db/db*. Se inocularon por vía tópica en heridas escindidas como se ha descrito anteriormente en ratones de tipo silvestre y *db/db* 0,5 x 10<sup>6</sup> UFC, 1 x 10<sup>6</sup> UFC (unidades formadoras de placas) o 2 x 10<sup>6</sup> UFC de *Staphylococcus aureus* dos días después de la escisión de la herida. Como se muestra en la Figura 58, los ratones *db/db* mostraron curación de heridas retardada en comparación con ratones de tipo silvestre, y la curación de heridas se retardó adicionalmente cuando la herida se infectó por bacterias en estos ratones en comparación con el control.

En experimentos separados, se comparó el efecto de la curación de heridas de IL-22 con otros agentes en el modelo de curación de heridas infectadas entablilladas. Dos días después de la escisión de la herida, la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina USA300 NRS 384 (NARSA) a 1 x 10<sup>6</sup> UFC en 30 µl de solución salina se inoculó en la superficie de la herida y se cubrió de nuevo con una película de Tegaderm. El tratamiento tópico comenzó 48 horas después de infección por *S. aureus* 30 µg de IL22-Fc o VEGF (Lote n.º 110308, Genentech) o PDGF (Lote n.º 0507CY420, PeproTech, Inc.) en 30 µl de solución salina 3 veces a la semana en lo sucesivo. Se registraron imágenes digitales de la herida antes del tratamiento y dos veces a la semana después del tratamiento hasta el cierre de las heridas. El porcentaje de cierre de herida se calculó a partir de las imágenes de heridas usando ImageJ, un programa de procesamiento de imágenes basado en java desarrollado en el NIH.

Como se muestra en la Figura 59, IL-22 Fc promovió una curación de heridas más rápida que VEGF cuando se aplicó la misma cantidad de los compuestos a heridas infectadas en el modelo de herida entablillada, que se asemejaba más estrechamente a la curación de heridas en el ser humano. A continuación, se ensayaron diferentes dosis de VEGF e IL-22 Fc en heridas infectadas. En este experimento, se creó una herida por escisión entablillada de 6 mm de diámetro en ratones *db/db* con glucosa en sangre > 300 mg/dl. En cada herida se inocularon 1 x 10<sup>6</sup> UFC de *S. aureus* USA 300. Se administraron por vía tópica diversas dosis de VEGF o IL-22 en solución salina tres veces por semana hasta el cierre de la herida. Se usó solución salina como un control. En el momento del cierre de

la herida, los ratones se sacrificaron y las muestras se sometieron a histología, inmunohistoquímica y análisis por PCR y recuento de UFC. Los resultados en la Figura 60 muestran que IL-22 Fc en la cantidad de 30 µg demostraba mejor eficacia de curación de heridas infectadas que 60 µg de VEGF. Por lo tanto, el cierre de superficie más rápido por VEGF observado en un modelo de herida no entablillada probablemente se debió a contracción de la piel del

5 ratón y los efectos de IL-22 Fc en la promoción de la proliferación de queratinocitos y reepitelización probablemente estaban enmascarados por la contracción de la piel del ratón.

Los resultados se muestran en la Figura 61, en la que se demostró que IL-22 Fc tenía eficacia superior a VEGF y PDGF cuando se aplicó la misma cantidad (30 µg) de cada compuesto a la herida. Se vio cierre completo de la

10 herida en herida entablillada infectada tratada con IL-22 Fc el día 15. En ratones tratados con VEGF o PDGF, sin embargo, no se vio cierre completo de herida entablillada infectada hasta el día 25, igual que la herida no infectada no tratada. El cierre de herida en el grupo de control, es decir, herida infectada no tratada, no se vio hasta el día 29. Sin quedar limitado al mecanismo o los mecanismos específicos, la superioridad de IL-22 Fc en la promoción de la

15 proliferación de queratinocitos, inducción de la neovascularización, inducción de proteasas para facilitar la remodelación y reparación tisular y las actividades antimicrobianas.

A continuación, se ensayó si IL-22 Fc puede administrarse en una formulación en gel para curación de heridas. La formulación en gel a modo de ejemplo usada en este experimento contenía fosfato sódico 10 mM a pH 7,1 con metionina 0,5 mg/g e hidroxipropilmetilcelulosa 3 % (HPMC E4M premium de Dow Chemicals), con o sin IL-22 Fc

20 1 mg/g. La solución de gel y solución de IL-22 Fc se mezclaron antes de aplicarse por vía tópica a la herida entablillada. La formulación que contenía IL-22 Fc también contenía una cantidad pequeña de sacarosa (< 20 mM) y P20 (< 0,002 %) portada desde la formulación de proteína original. Los resultados mostrados en la Figura 62 demuestran que IL-22 Fc tanto en solución como en formulación de gel promovió la curación de heridas en una

25 herida entablillada no infectada.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.*et al.*

30 <120> POLIPÉPTIDOS DE IL-22 Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE IL-22 FC Y MÉTODOS DE USO

<130> P5580R1-WO

35 <140> Por asignar  
<141> Con la presente

<150> US 61/800148  
<151> 15-03-2013

40 <150> US 61/800795  
<151> 15-03-2013

45 <150> US 61/801144  
<151> 15-03-2013

<150> US 61/821062  
<151> 08-05-2013

50 <150> US 61/860176  
<151> 30-07-2013

<160> 80

55 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 495  
<212> ADN  
60 <213> *Homo sapiens*

<220>  
<223> IL-22 humana

65 <400> 1

|            |             |            |             |            |            |     |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| atgggatggg | catgtatcat  | cctttttcta | gtagcaactg  | caactggagt | acattcagcg | 60  |
| cccatcagct | cccactgcag  | gcttgacaag | tccaacttcc  | agcagcccta | tatcaccaac | 120 |
| cgcaccttca | tgctggctaa  | ggaggctagc | ttggctgata  | acaacacaga | cgttcgtctc | 180 |
| attggggaga | aactgttcca  | cggagtcagt | atgagtgagc  | gctgctatct | gatgaagcag | 240 |
| gtgctgaact | tcacccottga | agaagtgctg | ttccctcaat  | ctgatagggt | ccagccttat | 300 |
| atgcaggagg | tggtgccott  | cctggccagg | ctcagcaaca  | ggctaagcac | atgtcatatt | 360 |
| gaaggtgatg | acctgcatat  | ccagaggaat | gtgcaaaaagc | tgaaggacac | agtgaaaaag | 420 |
| cttggagaga | gtggagagat  | caaagcaatt | ggagaactgg  | atttgctgtt | tatgtctctg | 480 |
| agaaatgcct | gcatt       |            |             |            |            | 495 |

<210> 2  
 <211> 165  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> IL-22 humana

<400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn  
 20 25 30  
 Phe Gln Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu  
 35 40 45  
 Ala Ser Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys  
 50 55 60  
 Leu Phe His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln  
 65 70 75 80  
 Val Leu Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg  
 85 90 95  
 Phe Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser  
 100 105 110  
 Asn Arg Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln  
 115 120 125  
 Arg Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser  
 130 135 140  
 Gly Glu Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Asn Ala Cys Ile  
 165

<210> 3  
 <211> 438  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> ADN de IL-22 (maduro)

<400> 3

gcgcccacatca gctcccaactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc 60  
 aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt 120  
 ctcatgtggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag 180

cagggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctct aatctgatag gttccagcct 240  
 tatatgcagg aggtgggtgcc ctctctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat 300  
 attgaagggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa 360  
 aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct 420  
 ctgagaaatg cctgcatt 438

<210> 4  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <223> IL-22 (maduro)  
 <400> 4

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

<210> 5

<211> 57  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia líder de IL-22  
 <400> 5  
 10 atgggatggt catgtatcat ccttttcta gtagcaactg caactggagt acattca 57  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <223> Secuencia líder de IL-22  
 20 <400> 6  
  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
  
 Val His Ser  
 <210> 7  
 25 <211> 1128  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (menos Lys C-terminal) N297G  
 35 <400> 7

gagcccatca gctccactg caggcttgac aagtcacact tccagcagcc ctatatcacc 60  
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt 120  
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag 180  
cagggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccctc aatctgatag gttccagcct 240  
tatatgcagg aggtggtgcc ctctctggcc aggtcagca acaggctaag cacatgtcat 300  
attgaagggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag 360  
aagcttgagg agagtggaga gatcaaagca attggagAAC tggatttgct gtttatgtct 420  
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc 480  
gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact 540  
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac 600  
cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 660  
ccgctggagg agcagttcgg aagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 720  
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgctc 780  
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 840  
ctgcccccat ccaggagga gatgaccaag aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa 900  
ggcttctacc ccagcgacat cgcgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 960  
tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gaaggctcct tcttctctca cagcaggcta 1020  
accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1080  
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggt 1128

<210> 8  
<211> 376  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<220>  
<223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (menos Lys C-terminal) N297G

<400> 8

# ES 2 676 023 T3

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

Cys Ile Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 180 185 190  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 195 200 205  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 210 215 220  
 Gln Phe Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 225 230 235 240  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 245 250 255  
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 260 265 270  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 275 280 285  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 290 295 300  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 325 330 335  
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 340 345 350  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 355 360 365  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 370 375

<210> 9  
 <211> 1128

|    |                                                                     |      |
|----|---------------------------------------------------------------------|------|
|    | <212> ADN                                                           |      |
|    | <213> Secuencia artificial                                          |      |
|    | <220>                                                               |      |
| 5  | <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético |      |
|    | <220>                                                               |      |
|    | <223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (menos Lys C-terminal) N297A          |      |
| 10 | <400> 9                                                             |      |
|    | gcgcccatca gctcccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc   | 60   |
|    | aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggctg ataacaacac agacgttcgt   | 120  |
|    | ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgcgtgcta tctgatgaag  | 180  |
|    | cagggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccttc aatctgatag gttccagcct  | 240  |
|    | tatatgcagg aggtggtgcc ctctcctggcc aggtcagca acaggctaag cacatgtcat   | 300  |
|    | attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag   | 360  |
|    | aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct   | 420  |
|    | ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc     | 480  |
|    | gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact   | 540  |
|    | ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac   | 600  |
|    | cccaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag    | 660  |
|    | ccgcgaggagg agcagttcgc tagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac  | 720  |
|    | caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgctc   | 780  |
|    | tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc   | 840  |
|    | ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa   | 900  |
|    | ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac    | 960  |
|    | tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta   | 1020 |
|    | accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag   | 1080 |
|    | gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggt                | 1128 |
| 15 | <210> 10                                                            |      |
|    | <211> 376                                                           |      |
|    | <212> PRT                                                           |      |
|    | <213> Secuencia artificial                                          |      |
|    | <220>                                                               |      |
| 20 | <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético    |      |
|    | <220>                                                               |      |
|    | <223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (menos Lys C-terminal) N297A          |      |
| 25 | <400> 10                                                            |      |

# ES 2 676 023 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Pro | Ile | Ser | Ser | His | Cys | Arg | Leu | Asp | Lys | Ser | Asn | Phe | Gln | Gln | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Pro | Tyr | Ile | Thr | Asn | Arg | Thr | Phe | Met | Leu | Ala | Lys | Glu | Ala | Ser | Leu | 20  | 25  | 30  |     |
| Ala | Asp | Asn | Asn | Thr | Asp | Val | Arg | Leu | Ile | Gly | Glu | Lys | Leu | Phe | His | 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Val | Ser | Met | Ser | Glu | Arg | Cys | Tyr | Leu | Met | Lys | Gln | Val | Leu | Asn | 50  | 55  | 60  |     |
| Phe | Thr | Leu | Glu | Glu | Val | Leu | Phe | Pro | Gln | Ser | Asp | Arg | Phe | Gln | Pro | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Tyr | Met | Gln | Glu | Val | Val | Pro | Phe | Leu | Ala | Arg | Leu | Ser | Asn | Arg | Leu | 85  | 90  | 95  |     |
| Ser | Thr | Cys | His | Ile | Glu | Gly | Asp | Asp | Leu | His | Ile | Gln | Arg | Asn | Val | 100 | 105 | 110 |     |
| Gln | Lys | Leu | Lys | Asp | Thr | Val | Lys | Lys | Leu | Gly | Glu | Ser | Gly | Glu | Ile | 115 | 120 | 125 |     |
| Lys | Ala | Ile | Gly | Glu | Leu | Asp | Leu | Leu | Phe | Met | Ser | Leu | Arg | Asn | Ala | 130 | 135 | 140 |     |
| Cys | Ile | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | 165 | 170 | 175 |     |
| Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | 180 | 185 | 190 |     |
| Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | 195 | 200 | 205 |     |
| Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | 210 | 215 | 220 |     |
| Gln | Phe | Ala | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | 245 | 250 | 255 |     |

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
305 310 315 320

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
325 330 335

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
370 375

<210> 11

<211> 1131

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (menos Lys C-terminal) N297G

<400> 11

gcgcccacatca gctcccaactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc 60

aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt 120

ctcattgggg agaaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag 180

caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccctc aatctgatag gttccagcct 240

tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggtcagca acaggctaag cacatgtcat 300

attgaagtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag 360

aagcttgagg agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct 420

ctgagaaatg cctgcattga gcccaaactc agtgacaaaa ctcacacatg cccacogtgc 480

```

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 540
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa 600
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 660
aagccgcggg aggagcagta cggaagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 780
gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac 840
accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 900
aaaggcttct atccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag 1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1080
gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg t 1131

```

<210> 12

<211> 377

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (menos Lys C-terminal) N297G

<400> 12

15

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Ala | Pro | Ile | Ser | Ser | His | Cys | Arg | Leu | Asp | Lys | Ser | Asn | Phe | Gln | Gln |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| Pro | Tyr | Ile | Thr | Asn | Arg | Thr | Phe | Met | Leu | Ala | Lys | Glu | Ala | Ser | Leu |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Ala | Asp | Asn | Asn | Thr | Asp | Val | Arg | Leu | Ile | Gly | Glu | Lys | Leu | Phe | His |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Gly | Val | Ser | Met | Ser | Glu | Arg | Cys | Tyr | Leu | Met | Lys | Gln | Val | Leu | Asn |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Phe | Thr | Leu | Glu | Glu | Val | Leu | Phe | Pro | Gln | Ser | Asp | Arg | Phe | Gln | Pro |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Tyr | Met | Gln | Glu | Val | Val | Pro | Phe | Leu | Ala | Arg | Leu | Ser | Asn | Arg | Leu |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Ser | Thr | Cys | His | Ile | Glu | Gly | Asp | Asp | Leu | His | Ile | Gln | Arg | Asn | Val |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |

Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile  
 115 120 125  
 Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala  
 130 135 140  
 Cys Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 165 170 175  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 180 185 190  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 195 200 205  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 225 230 235 240  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 245 250 255  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 260 265 270  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 275 280 285  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 290 295 300  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 305 310 315 320  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 325 330 335  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 340 345 350  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 355 360 365

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
370 375

- 5 <210> 13  
<211> 1131  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
- 15 <220>  
<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (menos Lys C-terminal) N297A
- 15 <400> 13
- |                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gcgcccatca gctcccaactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc | 60   |
| aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt   | 120  |
| ctcattgggg agaaaactgtt ccacggagtc agtatgagt agcgtgcta tctgatgaag   | 180  |
| cagggtgctga acttcaccct tgaagaagt ctgttcctc aatctgatag gttccagcct   | 240  |
| tatatgcagg aggtggtgcc ctccctggcc aggtcagca acaggctaag cacatgtcat   | 300  |
| attgaagggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaa agctgaagga cacagtgaag  | 360  |
| aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct  | 420  |
| ctgagaaatg cctgcattga gcccaaact agtgacaaa ctacacatg cccaccgtgc     | 480  |
| ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctc tcccccaaa acccaaggac    | 540  |
| accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtg tggaggacgt gagccacgaa    | 600  |
| gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtg aggtgcataa tgccaagaca   | 660  |
| aagccgcggg aggagcagta cgctagcacg taccgtgtg tcagcgtcct caccgtcctg   | 720  |
| caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaaca agccctcca    | 780  |
| gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac | 840  |
| accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc   | 900  |
| aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac  | 960  |
| aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggt ccttcttct ctacagcaag    | 1020 |
| ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtc tctcatgctc cgtgatgcat   | 1080 |
| gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg t            | 1131 |
- 20 <210> 14  
<211> 377  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fusión de IL-22 Fc IgG1 (menos Lys C-terminal) N297A

&lt;400&gt; 14

5

```

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

Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu
          20              25              30

Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe His
          35              40              45

Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn
 50              55              60

Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro
65              70              75              80

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

Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val
          100              105              110

Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile
          115              120              125

Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala
          130              135              140

Cys Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
145              150              155              160

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          165              170              175

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
          180              185              190

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
          195              200              205

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
210              215              220

```

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
225 230 235 240

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
245 250 255

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
260 265 270

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
275 280 285

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
290 295 300

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
305 310 315 320

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
325 330 335

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
355 360 365

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
370 375

<210> 15

<211> 1131

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (completo) N297G

<400> 15

```

gogcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc      60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggctg ataacaacac agacgttcgt      120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag      180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccttc aatctgatag gttccagcct      240
tatatgcagg aggtggtgcc ctccctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat      300

attgaagggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa      360
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct      420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc      480
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttccctgttc ccccaaaacc caaggacact      540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac      600
cccgagggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag      660
ccgcggggagg agcagttcgg aagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac      720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc      780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc      840
ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaaa      900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac      960
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta     1020
accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag     1080
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa a             1131

```

<210> 16

<211> 377

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (completo) N297G

<400> 16

# ES 2 676 023 T3

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

Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu  
20 25 30

Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe His  
35 40 45

Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn  
50 55 60

Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro  
65 70 75 80

Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg Leu  
 85 90 95  
 Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val  
 100 105 110  
 Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile  
 115 120 125  
 Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala  
 130 135 140  
 Cys Ile Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 180 185 190  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 195 200 205  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 210 215 220  
 Gln Phe Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 225 230 235 240  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 245 250 255  
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 260 265 270  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 275 280 285  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 290 295 300  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 325 330 335

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
370 375

<210> 17

<211> 1131

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (completo) N297A

<400> 17

```

gcgcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc      60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggctg ataacaacac agacgttcgt      120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag      180
caggtgctga acttcacct tgaagaagtg ctgttccctc aatctgatag gttccagcct      240
tatatgcagg aggtggtgcc ctctctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat      300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa      360
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct      420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtc aaatatggtc ccccatgccc accatgcccc      480
gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact      540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac      600
cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag      660
ccgcgggagg agcagttcgc tagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac      720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc      780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc      840
ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa      900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac      960
tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaggcta     1020
accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag     1080
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa a             1131

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 377

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fusión de IL-22 Fc IgG4 (completo) N297A

&lt;400&gt; 18

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

Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu  
20 25 30

Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe His  
35 40 45

Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn  
50 55 60

Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro  
65 70 75 80

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

Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val  
100 105 110

Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile  
115 120 125

Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala  
130 135 140

Cys Ile Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
145 150 155 160

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
180 185 190

15

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
210 215 220

Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
245 250 255

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
305 310 315 320

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
325 330 335

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
370 375

<210> 19

<211> 1134

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (completo) N297G

<400> 19

15 gcgccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc 60

```

aaccgcacct tcatgctggc taaggagget agcttggtctg ataacaacac agacgttctg 120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtctgcta tctgatgaag 180
caggtgctga acttcacctt tgaagaagtg ctgttccctc aatctgatag gttccagcct 240
tatatgcagg aggtggtgcc ctccctggcc aggtctcagca acaggctaag cacatgtcat 300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag 360
aagcttgagg agagtggaga gatcaaagca attggagaaac tggatttgct gtttatgtct 420
ctgagaaatg cctgcattga gcccaaactt agtgacaaaa ctacacatg cccacgtgac 480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac 540
accctcatga tctcccgagc ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 600
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 660
aagccgcggg aggagcagta cggaagcacg taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtctg 720
caccaggact ggctgaatgg caaggagta aagtgcagg tctccaacaa agccctocca 780
gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 840
accctgccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 900
aaaggcttct atccagcga catgcctgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa 960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tcgacgggt ccttcttct ctacagcaag 1020
ctcacgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaagctt tctcatgctc cgtgatgcat 1080
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1134

```

<210> 20

<211> 378

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (completo) N297G

<400> 20

# ES 2 676 023 T3

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

Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu  
20 25 30

Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe His  
35 40 45

Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn

# ES 2 676 023 T3

|                                                                 |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 50                                                              |     | 55  |     | 60  |     |
| Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro |     |     |     |     |     |
| 65                                                              |     | 70  |     | 75  | 80  |
| Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg Leu |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 85  |     | 90  |     | 95  |
| Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 100 |     | 105 |     | 110 |
| Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 115 |     | 120 |     | 125 |
| Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 130 |     | 135 |     | 140 |
| Cys Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys |     |     |     |     |     |
| 145                                                             |     | 150 |     | 155 | 160 |
| Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 165 |     | 170 |     | 175 |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 180 |     | 185 |     | 190 |
| Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 195 |     | 200 |     | 205 |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 210 |     | 215 |     | 220 |
| Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu |     |     |     |     |     |
| 225                                                             |     | 230 |     | 235 | 240 |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 245 |     | 250 |     | 255 |
| Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 260 |     | 265 |     | 270 |
| Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 275 |     | 280 |     | 285 |
| Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 290 |     | 295 |     | 300 |

# ES 2 676 023 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
305 310 315 320

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
325 330 335

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
355 360 365

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
370 375

<210> 21

<211> 1134

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (completo) N297A

<400> 21

```

gagcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc      60
aacgcacact tcatgctggc taaggaggct agcttggctg ataacaacac agacgttcgt      120
ctcattgggg agaaactggt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag      180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccttc aatctgatag gttccagcct      240
tatatgcagg aggtgggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat      300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag      360
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct      420
ctgagaaatg cctgcattga gcccaaactc agtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc      480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac      540
accctcatga tctcccgagc ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa      600
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      660
aagccgcggg aggagcagta cgctagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca      780
gcccccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac      840
accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      900

aaaggttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac      960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag      1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat      1080
gaggtctctg acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa          1134

```

<210> 22

<211> 378

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (completo) N297A

<400> 22

# ES 2 676 023 T3

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

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

<210> 23  
<211> 1128  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (wt N297G menos Lys)

5

<400> 23

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| gcgcccatca gctcccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc   | 60   |
| aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggttg ataacaacac agacgttcgt   | 120  |
| ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag   | 180  |
| cagggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccctc aatctgatag gttccagcct  | 240  |
| tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat   | 300  |
| attgaagggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag  | 360  |
| aagcttgag agagtggaga gatcaaagca attggagaaac tggatttgct gtttatgtct   | 420  |
| ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtcc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc    | 480  |
| gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact    | 540  |
| ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac   | 600  |
| cccgagggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag  | 660  |
| ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac   | 720  |
| caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgtcc   | 780  |
| tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc   | 840  |
| ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa | 900  |
| ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac   | 960  |
| tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta   | 1020 |
| accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag  | 1080 |
| gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggt                | 1128 |

10

<210> 24

<211> 376

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (wt N297G menos Lys)

20

<400> 24

ES 2 676 023 T3

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

Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu  
20 25 30

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Asp | Asn | Asn | Thr | Asp | Val | Arg | Leu | Ile | Gly | Glu | Lys | Leu | Phe | His |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Val | Ser | Met | Ser | Glu | Arg | Cys | Tyr | Leu | Met | Lys | Gln | Val | Leu | Asn |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Phe | Thr | Leu | Glu | Glu | Val | Leu | Phe | Pro | Gln | Ser | Asp | Arg | Phe | Gln | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Tyr | Met | Gln | Glu | Val | Val | Pro | Phe | Leu | Ala | Arg | Leu | Ser | Asn | Arg | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ser | Thr | Cys | His | Ile | Glu | Gly | Asp | Asp | Leu | His | Ile | Gln | Arg | Asn | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gln | Lys | Leu | Lys | Asp | Thr | Val | Lys | Lys | Leu | Gly | Glu | Ser | Gly | Glu | Ile |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Lys | Ala | Ile | Gly | Glu | Leu | Asp | Leu | Leu | Phe | Met | Ser | Leu | Arg | Asn | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Cys | Ile | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Gly | Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly                                 |     |     |
| 370                                                             | 375 |     |

<210> 25

<211> 1131

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (wt N297G menos Lys)

<400> 25

```

gcgcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tocagcagcc ctatatcaacc      60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttctgt      120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag      180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccttc aatctgatag gttccagcct      240
tatatgcagg aggtggtgcc cttoctggcc aggtcagca acaggctaag cacatgtcat      300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag      360
aagcttgagg agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct      420
ctgagaaatg cctgcattga gcccaaactc agtgacaaaa ctacacatg cccacogtgc      480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac      540
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa      600
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      660
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtct caccgtctgt      720

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca      780
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac      840
accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      900
aaaggcttct atccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gcgggagaac      960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tcgacggct cttcttctct ctacagcaag     1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat     1080
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctcggg t                      1131

```

<210> 26  
 <211> 377  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<220>  
 <223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (wt N297G menos Lys)

<400> 26

# ES 2 676 023 T3

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

Cys Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 145 150 155 160

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 165 170 175

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 180 185 190

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 195 200 205

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 210 215 220

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 225 230 235 240

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 245 250 255

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 260 265 270

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 275 280 285

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 290 295 300

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 305 310 315 320

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 325 330 335

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 355 360 365

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 370 375

&lt;210&gt; 27

<211> 1131  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>  
<223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (N297 wt)

10 <400> 27

```

gcgcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc      60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggctg ataacaacac agacgttcgt      120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtctgcta tctgatgaag      180
cagggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccctc aatctgatag gttccagcct      240
tatatgcagg aggtgggtgcc ctctctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat      300
attgaagggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag      360
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct      420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtcc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc      480
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact      540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac      600
cccgagggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag      660
ccgcggggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac      720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgctc      780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc      840
ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa      900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac      960
tacaagacca cgctctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaggcta     1020
accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag     1080
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa a              1131

```

15 <210> 28  
<211> 377  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>  
<223> Fusión de IL-22 Fc IgG4 (N297 wt)

25 <400> 28

# ES 2 676 023 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Ala | Pro | Ile | Ser | Ser | His | Cys | Arg | Leu | Asp | Lys | Ser | Asn | Phe | Gln | Gln |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| Pro | Tyr | Ile | Thr | Asn | Arg | Thr | Phe | Met | Leu | Ala | Lys | Glu | Ala | Ser | Leu |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Ala | Asp | Asn | Asn | Thr | Asp | Val | Arg | Leu | Ile | Gly | Glu | Lys | Leu | Phe | His |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Gly | Val | Ser | Met | Ser | Glu | Arg | Cys | Tyr | Leu | Met | Lys | Gln | Val | Leu | Asn |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Phe | Thr | Leu | Glu | Glu | Val | Leu | Phe | Pro | Gln | Ser | Asp | Arg | Phe | Gln | Pro |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Tyr | Met | Gln | Glu | Val | Val | Pro | Phe | Leu | Ala | Arg | Leu | Ser | Asn | Arg | Leu |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Ser | Thr | Cys | His | Ile | Glu | Gly | Asp | Asp | Leu | His | Ile | Gln | Arg | Asn | Val |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Gln | Lys | Leu | Lys | Asp | Thr | Val | Lys | Lys | Leu | Gly | Glu | Ser | Gly | Glu | Ile |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Lys | Ala | Ile | Gly | Glu | Leu | Asp | Leu | Leu | Phe | Met | Ser | Leu | Arg | Asn | Ala |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Cys | Ile | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |  |
| Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys |  |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
305 310 315 320

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
325 330 335

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
370 375

<210> 29

<211> 1134

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (N297 wt)

<400> 29

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gogcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc  | 60  |
| aacgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt   | 120 |
| ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag | 180 |
| caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccttc aatctgatag gttccagcct | 240 |
| tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat | 300 |
| attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa | 360 |
| aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct | 420 |
| ctgagaaatg cctgcattga gcccaaactc agtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc | 480 |

```

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac      540
accctcatga tctcccgga cctgaggtc acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa      600
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      660
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca      780
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac      840
accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      900
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC      960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag     1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACgtct tctcatgctc cgtgatgcat     1080
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa              1134

```

<210> 30  
 <211> 378  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<220>  
 <223> Fusión de IL-22 Fc IgG1 (N297 wt)

<400> 30

# ES 2 676 023 T3

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

Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu  
20 25 30

Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe His  
35 40 45

Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn  
50 55 60

Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro  
65 70 75 80

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

Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val  
100 105 110

# ES 2 676 023 T3

Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile  
 115 120 125  
 Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala  
 130 135 140  
 Cys Ile Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 165 170 175  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 180 185 190  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 195 200 205  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 225 230 235 240  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 245 250 255  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 260 265 270  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 275 280 285  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 290 295 300  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 305 310 315 320  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 325 330 335  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 340 345 350  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 355 360 365

# ES 2 676 023 T3

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
370 375

5 <210> 31  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido de bisagra sintético  
<400> 31

Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5

15 <210> 32  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético  
<400> 32

Asp Lys Thr His Thr  
1 5

25 <210> 33  
<211> 10  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético  
35 <400> 33

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

40 <210> 34  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético  
<400> 34

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10

50 <210> 35  
<211> 12  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 35

5                    Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
                    1                         5                             10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

15      <400> 36

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10

<210> 37

20      <211> 14

&lt;212&gt; PRT

### <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 37

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10

30

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

### <213> Secuencia artificial

35

$\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 38

40

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

<210> 39

<211> 16

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

50

<400> 39

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

55

<210> 40

<211> 10

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 40

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
 1 5 10

10 <210> 41  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 41

20

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr  
 1 5

25 <210> 42  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético (IgG3)

<400> 42

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr  
 1 5 10

35 <210> 43  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 43

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 1 5

45 <210> 44

50 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 44

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
1 5

5 <210> 45  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético  
<400> 45

Gly Gly Ser  
1

15 <210> 46  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético  
<400> 46

Gly Gly Gly Ser  
1

25 <210> 47  
<211> 5  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético  
35 <400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

40 <210> 48  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> *Pan troglodytes*

45 <400> 48

# ES 2 676 023 T3

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

<210> 49  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> *Pongo abelii*

<400> 49

# ES 2 676 023 T3

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

Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu  
20 25 30

Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe Arg  
35 40 45

Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn  
50 55 60

Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro  
65 70 75 80

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

Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val  
100 105 110

Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile  
115 120 125

Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala  
130 135 140

Cys Ile  
145

<210> 50  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

<400> 50

# ES 2 676 023 T3

Leu Pro Val Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln Gln  
1 5 10 15

Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu  
20 25 30

Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe Arg  
35 40 45

Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn  
50 55 60

Phe Thr Leu Glu Asp Val Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro  
65 70 75 80

Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu  
85 90 95

Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn Val  
100 105 110

Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile  
115 120 125

Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala  
130 135 140

Cys Val  
145

<210> 51  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> *Canis familiaris*

<400> 51

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

<210> 52

<211> 94

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo de proteína de fusión de IL-22 Fc IgG1 sintético

<400> 52

ttgaattcca ccatgggatg gtcattgtatc atcctttttc tagtagcaac tgcaactgga 60

gtacattcag cgcccatcag ctccctactgc aggc 94

15 <210> 53

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso de fusión de IL-22 Fc IgG1 sintético

|    |                                                                                                          |    |  |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|--|
|    | <400> 53<br>aggtcgactc atttaccgag agacagggag agg                                                         | 33 |  |
| 5  | <210> 54<br><211> 94<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                          |    |  |
| 10 | <220><br><223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo de fusión de IL-22 Fc IgG4 sintético |    |  |
|    | <400> 54                                                                                                 |    |  |
|    | ttgaattcca ccatgggatg gtcattgtatc atcctttttc tagtagcaac tgcaactgga                                       | 60 |  |
| 15 | gtacattcag cgcccatcag ctcccactgc aggc                                                                    | 94 |  |
|    | <210> 55<br><211> 33<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                          |    |  |
| 20 | <220><br><223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso de fusión de IL-22 Fc IgG4 sintético |    |  |
| 25 | <400> 55<br>aggtcgactt atttaccag agacagggag agg                                                          | 33 |  |
|    | <210> 56<br><211> 35<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                          |    |  |
| 30 | <220><br><223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo de IgG1 N297G sintético              |    |  |
| 35 | <400> 56<br>gcgggaggag cagtacggaa gcacgtaccg tgtgg                                                       | 35 |  |
| 40 | <210> 57<br><211> 35<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                          |    |  |
| 45 | <220><br><223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso de IgG1 N297G sintético              |    |  |
|    | <400> 57<br>ccacaggtga cgtgcttccg tactgctcct cccgc                                                       | 35 |  |
| 50 | <210> 58<br><211> 51<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial                                          |    |  |
| 55 | <220><br><223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo de IgG4 N297G sintético              |    |  |
|    | <400> 58<br>acaaagccgc gggaggagca gtccggaagc acgtaccgtg tggcagcgt c                                      | 51 |  |
| 60 | <210> 59<br><211> 51                                                                                     |    |  |

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso de IgG4 N297G sintético

<400> 59

gacgctgacc acacggtacg tgcttccgaa ctgctcctcc cgcggtttg t 51

10

<210> 60

<211> 411

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

20

<223> Fusión de IL-22 Fc IgG2a

<400> 60

Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu  
1 5 10 15

Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn  
20 25 30

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

Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser  
50 55 60

Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe  
65 70 75 80

Arg Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu  
85 90 95

Asn Phe Thr Leu Glu Asp Val Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln  
100 105 110

Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln  
115 120 125

Leu Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn  
130 135 140

Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu  
145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn  
165 170 175

Ala Cys Val Ala Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys  
180 185 190

Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
195 200 205

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr  
210 215 220

Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser  
225 230 235 240

Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His  
245 250 255

Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile  
260 265 270

Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn  
275 280 285

Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys  
290 295 300

Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu  
305 310 315 320

Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |
| Met | Pro | Glu | Asp | Ile | Tyr | Val | Glu | Trp | Thr | Asn | Asn | Gly | Lys | Thr | Glu |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Leu | Asn | Tyr | Lys | Asn | Thr | Glu | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Tyr |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Phe | Met | Tyr | Ser | Lys | Leu | Arg | Val | Glu | Lys | Lys | Asn | Trp | Val | Glu | Arg |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Asn | Ser | Tyr | Ser | Cys | Ser | Val | Val | His | Glu | Gly | Leu | His | Asn | His | His |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Thr | Thr | Lys | Ser | Phe | Ser | Arg | Thr | Pro | Gly | Lys |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     |     |

<210> 61

<211> 372

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>

<223> Botón de fusión de IL-22 IgG1 (T366W) menos Lys

<400> 61

# ES 2 676 023 T3

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

Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu  
20 25 30

Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe His  
35 40 45

Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn  
50 55 60

Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro  
65 70 75 80

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

Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val  
100 105 110

# ES 2 676 023 T3

Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile  
 115 120 125  
 Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala  
 130 135 140  
 Cys Ile Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 165 170 175  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 180 185 190  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 195 200 205  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 210 215 220  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 245 250 255  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 260 265 270  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 275 280 285  
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 290 295 300  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 305 310 315 320  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 325 330 335  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 340 345 350  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 355 360 365

**Leu Ser Pro Gly**  
**370**

<210> 62  
<211> 226  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<220>  
<223> Ojal de Fc monomérico

<400> 62

```

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                20              25              30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
          35              40              45

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65              70              75              80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
          85              90              95

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
          165              170              175

```

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val  
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
210 215 220

Pro Gly  
225

<210> 63  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 63

Gly Gly Gly Ser Thr His Thr  
1 5

<210> 64  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 64

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10

<210> 65  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 65

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10 15

<210> 66  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 66

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10

5

<210> 67  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético

15

Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10

20

<210> 68  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético  
<400> 68

Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10

30

<210> 69  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido enlazador sintético  
<400> 69

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
1 5 10 15

40

<210> 70  
<211> 1152  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

45

<220>  
<221> CDS  
<222> (58)..(597)

50

<400> 70

cttcagaaca ggttctcctt ccccagtcac cagttgctcg agttagaatt gtctgca

57

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| atg gcc gcc ctg cag aaa tct gtg agc tct ttc ctt atg ggg acc ctg<br>Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu<br>1 5 10 15       | 105  |
| gcc acc agc tgc ctc ctt ctc ttg gcc ctc ttg gta cag gga gga gca<br>Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala<br>20 25 30        | 153  |
| gct gcg ccc atc agc tcc cac tgc agg ctt gac aag tcc aac ttc cag<br>Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln<br>35 40 45        | 201  |
| cag ccc tat atc acc aac cgc acc ttc atg ctg gct aag gag gct agc<br>Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser<br>50 55 60        | 249  |
| ttg gct gat aac aac aca gac gtt cgt ctc att ggg gag aaa ctg ttc<br>Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe<br>65 70 75 80     | 297  |
| cac gga gtc agt atg agt gag cgc tgc tat ctg atg aag cag gtg ctg<br>His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu<br>85 90 95        | 345  |
| aac ttc acc ctt gaa gaa gtg ctg ttc cct caa tct gat agg ttc cag<br>Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln<br>100 105 110     | 393  |
| cct tat atg cag gag gtg gtg ccc ttc ctg gcc agg ctc agc aac agg<br>Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg<br>115 120 125     | 441  |
| cta agc aca tgt cat att gaa ggt gat gac ctg cat atc cag agg aat<br>Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn<br>130 135 140     | 489  |
| gtg caa aag ctg aag gac aca gtg aaa aag ctt gga gag agt gga gag<br>Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu<br>145 150 155 160 | 537  |
| atc aaa gca att gga gaa ctg gat ttg ctg ttt atg tct ctg aga aat<br>Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn<br>165 170 175     | 585  |
| gcc tgc att tga ccagagcaaaa gctgaaaaat gaataactaa cccctttcc<br>Ala Cys Ile                                                                            | 637  |
| ctgctagaaa taacaattag atgccccaaa gcgatttttt ttaaccaaaa ggaagatggg                                                                                     | 697  |
| aagccaaact ccatcatgat ggggtgattc caaatgaacc cctgcgttag ttacaaagga                                                                                     | 757  |
| aaccaatgcc acttttggtt ataagaccag aaggtagact ttotaagcat agatatttat                                                                                     | 817  |
| tgataacatt tcattgtaac tgggtgttcta tacacagaaa acaattttatt ttttaaataa                                                                                   | 877  |
| ttgtcttttt ccataaaaaa gattactttc cattccttta ggggaaaaaa ccctaaata                                                                                      | 937  |
| gcttcatgtt tccataatca gtactttata tttataaatg tattttattat tattataaga                                                                                    | 997  |
| ctgcatttta tttatatcat tttattaata tggattttatt tatagaaaca tcattcgata                                                                                    | 1057 |

ttgctacttg agtgtaaggc taatattgat atttatgaca ataattatag agctataaca 1117

tgtttatttg acctcaataa acacttgat atccc 1152

<210> 71

<211> 179

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 71

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu  
1 5 10 15

Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala  
20 25 30

Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln  
35 40 45

Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser  
50 55 60

Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe  
65 70 75 80

His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu  
85 90 95

Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln  
100 105 110

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

Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn  
130 135 140

Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu  
145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn  
165 170 175

Ala Cys Ile

<210> 72

<211> 1236

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

5 &lt;223&gt; Polipéptido sintético

&lt;400&gt; 72

```

atggctgtcc tgcagaaatc tatgagtttt tcccttatgg ggactttggc cgccagctgc      60
ctgctttctca ttgccctgtg ggcccaggag gcaaatgcgc tgcccgtcaa cacccggtgc      120
aagcttgagg tgtccaactt ccagcagcca tacatcgtca accgcacctt tatgctggcc      180
aaggaggcca gccttgcaga taacaacaca gatgtccggc tcatcgggga gaaactgttc      240
cgaggagtca gtgctaagga tcagtgtctac ctgatgaagc aggtgtctca cttcacccctg      300
gaagacgttc tgctccccc gtcagacagg ttccagccct acatgcagga ggtgggtgcct      360
ttcctgacca aactcagcaa tcagctcagc tcctgtcaca tcagcgggtga cgaccagaac      420
atccagaaga atgtcagaag gctgaaggag acagtgaaaa agcttgagga gagtggagag      480
atcaaggcga ttgggggaact ggacctgctg tttatgtctc tgagaaatgc ttgcgtcgct      540
cgaggacca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt      600
ggaccatccg tcttcatctt cctccaaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc      660
cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc      720
tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gctcagacac aaacccatag agaggattac      780
aacagtactc tacgcgtggt cagtgcctc cccatccagc accaggactg gatgagtggc      840
aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc      900
tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca caggtatatg tcttgccctc accagaagaa      960
gagatgacta agaaacaggt cactctgacc tgcattggtc cagacttcat gcctgaagac     1020
atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca     1080
gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac     1140
tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca gtggtccacg aggtctgca caatcaccac     1200
acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aaatga                                1236

```

10

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

15

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polipéptido sintético

&lt;400&gt; 73

20

# ES 2 676 023 T3

Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu  
1 5 10 15

Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn

# ES 2 676 023 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|     | 20  |     | 25  |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Leu | Pro | Val | Asn | Thr | Arg | Cys | Lys | Leu | Glu | Val | Ser | Asn | Phe | Gln |  |  |  |  |
|     | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |  |  |
| Gln | Pro | Tyr | Ile | Val | Asn | Arg | Thr | Phe | Met | Leu | Ala | Lys | Glu | Ala | Ser |  |  |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Ala | Asp | Asn | Asn | Thr | Asp | Val | Arg | Leu | Ile | Gly | Glu | Lys | Leu | Phe |  |  |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |  |  |
| Arg | Gly | Val | Ser | Ala | Lys | Asp | Gln | Cys | Tyr | Leu | Met | Lys | Gln | Val | Leu |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |  |  |
| Asn | Phe | Thr | Leu | Glu | Asp | Val | Leu | Leu | Pro | Gln | Ser | Asp | Arg | Phe | Gln |  |  |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |  |  |
| Pro | Tyr | Met | Gln | Glu | Val | Val | Pro | Phe | Leu | Thr | Lys | Leu | Ser | Asn | Gln |  |  |  |  |
|     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Ser | Ser | Cys | His | Ile | Ser | Gly | Asp | Asp | Gln | Asn | Ile | Gln | Lys | Asn |  |  |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Val | Arg | Arg | Leu | Lys | Glu | Thr | Val | Lys | Lys | Leu | Gly | Glu | Ser | Gly | Glu |  |  |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |  |
| Ile | Lys | Ala | Ile | Gly | Glu | Leu | Asp | Leu | Leu | Phe | Met | Ser | Leu | Arg | Asn |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |  |  |
| Ala | Cys | Val | Ala | Arg | Gly | Pro | Thr | Ile | Lys | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Lys |  |  |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |  |  |
| Cys | Pro | Ala | Pro | Asn | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro |  |  |  |  |
|     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |  |
| Pro | Lys | Ile | Lys | Asp | Val | Leu | Met | Ile | Ser | Leu | Ser | Pro | Ile | Val | Thr |  |  |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Glu | Asp | Asp | Pro | Asp | Val | Gln | Ile | Ser |  |  |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |
| Trp | Phe | Val | Asn | Asn | Val | Glu | Val | His | Thr | Ala | Gln | Thr | Gln | Thr | His |  |  |  |  |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Glu | Asp | Tyr | Asn | Ser | Thr | Leu | Arg | Val | Val | Ser | Ala | Leu | Pro | Ile |  |  |  |  |
|     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |  |

Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn  
275 280 285

Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys  
290 295 300

Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu  
305 310 315 320

Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe  
325 330 335

Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu  
340 345 350

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

Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg  
370 375 380

Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His  
385 390 395 400

Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
405 410

<210> 74  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador sintético

<400> 74  
aggtccattc agatgctggt 20

<210> 75  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador sintético

<400> 75  
taggtgtggt tgacgtggag 20

<210> 76  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

&lt;223&gt; Cebador sintético

&lt;400&gt; 76

ccacccacac ctcacaccgg 20

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 177

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 77

Met Lys Leu Gln Cys Val Ser Leu Trp Leu Leu Gly Thr Ile Leu Ile  
1 5 10 15

Leu Cys Ser Val Asp Asn His Gly Leu Arg Arg Cys Leu Ile Ser Thr  
20 25 30

Asp Met His His Ile Glu Glu Ser Phe Gln Glu Ile Lys Arg Ala Ile  
35 40 45

Gln Ala Lys Asp Thr Phe Pro Asn Val Thr Ile Leu Ser Thr Leu Glu  
50 55 60

Thr Leu Gln Ile Ile Lys Pro Leu Asp Val Cys Cys Val Thr Lys Asn  
65 70 75 80

Leu Leu Ala Phe Tyr Val Asp Arg Val Phe Lys Asp His Gln Glu Pro  
85 90 95

Asn Pro Lys Ile Leu Arg Lys Ile Ser Ser Ile Ala Asn Ser Phe Leu  
100 105 110

Tyr Met Gln Lys Thr Leu Arg Gln Cys Gln Glu Gln Arg Gln Cys His  
115 120 125

Cys Arg Gln Glu Ala Thr Asn Ala Thr Arg Val Ile His Asp Asn Tyr  
130 135 140

Asp Gln Leu Glu Val His Ala Ala Ala Ile Lys Ser Leu Gly Glu Leu  
145 150 155 160

Asp Val Phe Leu Ala Trp Ile Asn Lys Asn His Glu Val Met Ser Ser  
165 170 175

Ala

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 176

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 78

```

Met Lys Ala Ser Ser Leu Ala Phe Ser Leu Leu Ser Ala Ala Phe Tyr
1          5          10          15

Leu Leu Trp Thr Pro Ser Thr Gly Leu Lys Thr Leu Asn Leu Gly Ser
20          25          30

Cys Val Ile Ala Thr Asn Leu Gln Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Glu
35          40          45

Ile Arg Gly Ser Val Gln Ala Lys Asp Gly Asn Ile Asp Ile Arg Ile
50          55          60

Leu Arg Arg Thr Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Pro Ala Asn Arg Cys
65          70          75          80

Cys Leu Leu Arg His Leu Leu Arg Leu Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys
85          90          95

Asn Tyr Gln Thr Pro Asp His Tyr Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu
100         105         110

Ala Asn Ser Phe Leu Thr Ile Lys Lys Asp Leu Arg Leu Cys His Ala
115         120         125

His Met Thr Cys His Cys Gly Glu Glu Ala Met Lys Lys Tyr Ser Gln
130         135         140

Ile Leu Ser His Phe Glu Lys Leu Glu Pro Gln Ala Ala Val Val Lys
145         150         155         160

Ala Leu Gly Glu Leu Asp Ile Leu Leu Gln Trp Met Glu Glu Thr Glu
165         170         175

```

5

<210> 79  
 <211> 207  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 79

Met Asn Phe Gln Gln Arg Leu Gln Ser Leu Trp Thr Leu Ala Ser Arg  
1 5 10 15

Pro Phe Cys Pro Pro Leu Leu Ala Thr Ala Ser Gln Met Gln Met Val

20

25

30

Val Leu Pro Cys Leu Gly Phe Thr Leu Leu Leu Trp Ser Gln Val Ser  
35 40 45

Gly Ala Gln Gly Gln Glu Phe His Phe Gly Pro Cys Gln Val Lys Gly  
50 55 60

Val Val Pro Gln Lys Leu Trp Glu Ala Phe Trp Ala Val Lys Asp Thr  
65 70 75 80

Met Gln Ala Gln Asp Asn Ile Thr Ser Ala Arg Leu Leu Gln Gln Glu  
85 90 95

Val Leu Gln Asn Val Ser Asp Ala Glu Ser Cys Tyr Leu Val His Thr  
100 105 110

Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Lys Thr Val Phe Lys Asn Tyr His Asn Arg  
115 120 125

Thr Val Glu Val Arg Thr Leu Lys Ser Phe Ser Thr Leu Ala Asn Asn  
130 135 140

Phe Val Leu Ile Val Ser Gln Leu Gln Pro Ser Gln Glu Asn Glu Met  
145 150 155 160

Phe Ser Ile Arg Asp Ser Ala His Arg Arg Phe Leu Leu Phe Arg Arg  
165 170 175

Ala Phe Lys Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Leu Gly  
180 185 190

Glu Val Asp Ile Leu Leu Thr Trp Met Gln Lys Phe Tyr Lys Leu  
195 200 205

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 171

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 80

# ES 2 676 023 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| Met | Leu | Val | Asn | Phe | Ile | Leu | Arg | Cys | Gly | Leu | Leu | Leu | Val | Thr | Leu |  |  |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |  |  |
| Ser | Leu | Ala | Ile | Ala | Lys | His | Lys | Gln | Ser | Ser | Phe | Thr | Lys | Ser | Cys |  |  |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |  |
| Tyr | Pro | Arg | Gly | Thr | Leu | Ser | Gln | Ala | Val | Asp | Ala | Leu | Tyr | Ile | Lys |  |  |  |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |  |  |  |
| Ala | Ala | Trp | Leu | Lys | Ala | Thr | Ile | Pro | Glu | Asp | Arg | Ile | Lys | Asn | Ile |  |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |
| Arg | Leu | Leu | Lys | Lys | Lys | Thr | Lys | Lys | Gln | Phe | Met | Lys | Asn | Cys | Gln |  |  |  |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |  |  |  |
| Phe | Gln | Glu | Gln | Leu | Leu | Ser | Phe | Phe | Met | Glu | Asp | Val | Phe | Gly | Gln |  |  |  |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |  |  |  |
| Leu | Gln | Leu | Gln | Gly | Cys | Lys | Lys | Ile | Arg | Phe | Val | Glu | Asp | Phe | His |  |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |  |
| Ser | Leu | Arg | Gln | Lys | Leu | Ser | His | Cys | Ile | Ser | Cys | Ala | Ser | Ser | Ala |  |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |
| Arg | Glu | Met | Lys | Ser | Ile | Thr | Arg | Met | Lys | Arg | Ile | Phe | Tyr | Arg | Ile |  |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |  |
| Gly | Asn | Lys | Gly | Ile | Tyr | Lys | Ala | Ile | Ser | Glu | Leu | Asp | Ile | Leu | Leu |  |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |
| Ser | Trp | Ile | Lys | Lys | Leu | Leu | Glu | Ser | Ser | Gln |     |     |     |     |     |  |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |     |  |  |  |

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de IL-22 Fc que se une con el receptor de IL-22, comprendiendo dicha proteína de fusión de IL-22 Fc un polipéptido de IL-22 ligado a una región Fc por un enlazador, en donde la región Fc comprende una  
5 región de bisagra, un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 10, en donde el resto N297 se cambia a Gly o Ala y en donde la región Fc no está glucosilada.
- 10 2. La proteína de fusión de IL-22 Fc de la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 10.
- 15 3. La proteína de fusión de IL-22 Fc de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el enlazador comprende las secuencias de aminoácidos SKYGPP (SEQ ID NO: 43) o RVESKYGPP (SEQ ID NO: 44).
4. La proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
- 20 5. La proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.
6. La proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 10.
- 25 7. La proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce por un proceso que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora capaz de expresar la proteína de fusión de IL-22 Fc en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión de IL-22 Fc, en donde la célula hospedadora comprende un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de  
30 fusión de IL-22 Fc, en donde, opcionalmente, el proceso comprende además la etapa de obtener la proteína de fusión de IL-22 Fc del cultivo celular o del medio de cultivo.
8. La proteína de fusión de IL-22 Fc de la reivindicación 7, en donde la célula hospedadora es una célula CHO.
- 35 9. La proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la proteína de fusión de IL-22 es una proteína de fusión de IL-22 Fc dimerica o es una proteína de fusión de IL-22 Fc monomérica.
10. La proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido de IL-22 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 40 11. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 11, en donde el ácido nucleico codifica la proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 10.
- 45 13. El ácido nucleico aislado de las reivindicaciones 11 o 12 que comprende o consiste en la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9.
- 50 14. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13.
15. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 14.
16. La célula hospedadora de la reivindicación 15, en donde la célula hospedadora es una célula procariota o una  
55 célula eucariota, o una célula de *E. coli* o una célula CHO.
17. Un método para preparar una proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende la etapa de cultivar la célula hospedadora de las reivindicaciones 15 o 16 en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión de IL-22 Fc.
- 60 18. El método de la reivindicación 17, que comprende además la etapa de obtener la proteína de fusión de IL-22 Fc del cultivo celular o del medio de cultivo.
19. El método de las reivindicaciones 17 o 18, en donde la célula hospedadora es una célula de *E. coli*.
- 65 20. El método de las reivindicaciones 17 o 18, en donde la célula hospedadora es una célula CHO.

21. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de IL-22 Fc según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende o  
5 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 10.
23. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 21-22, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc se produce en una célula CHO.
24. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 21-23, que comprende además un  
10 agente terapéutico adicional.
25. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es un agente gelificante.  
15
26. La composición farmacéutica de la reivindicación 25, en donde el agente gelificante es (i) un polisacárido, (ii) un agente celulósico, (iii) metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polímeros en bloque POE-POP, alginato, ácido hialurónico, ácido poliacrílico, hidroxietilmetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa o  
20 (iv) hidroxipropilmetilcelulosa.
27. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 25-26, en donde la composición farmacéutica es para administración tópica.
28. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las  
25 reivindicaciones 1-10 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 21-24, para su uso en un método de:
  - (a) tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en un sujeto que lo necesite;
  - (b) inhibición de la infección microbiana en el intestino, conservación de células caliciformes en el intestino  
30 durante una infección microbiana, potenciación de la integridad de células epiteliales, proliferación de células epiteliales, diferenciación de células epiteliales, migración de células epiteliales o curación de heridas epiteliales en el intestino, en un sujeto que lo necesite;
  - (c) tratamiento de lesión renal aguda o pancreatitis aguda en un sujeto que lo necesite;
  - (d) prevención o tratamiento de una afección cardiovascular, afección que incluye una patología de formación de  
35 placas ateroscleróticas, en un sujeto que lo necesite;
  - (e) tratamiento de síndrome metabólico en un sujeto que lo necesite; o
  - (f) tratamiento de endotoxemia aguda, septicemia, o ambas, en un sujeto que lo necesite.
29. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 28(a), en donde la EII es colitis ulcerosa o  
40 enfermedad de Crohn.
30. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 28(b), en donde la célula epitelial es célula epitelial intestinal.
31. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 28(d), (i) en donde la afección cardiovascular se  
45 selecciona del grupo que consiste en arteriopatía coronaria, enfermedad microvascular coronaria, ictus, arteriopatía carotídea, arteriopatía periférica y nefropatía crónica; (ii) que comprende además ralentizar la progresión de formación de placas ateroscleróticas o prevenir las indicaciones de aterosclerosis, en donde, opcionalmente, las indicaciones de aterosclerosis incluyen acumulación de placas o inflamación vascular; o (iii) en donde se ha  
50 identificado que el sujeto está en riesgo de desarrollar una afección cardiovascular.
32. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 28(e), que comprende además reducir uno o más factores de riesgo asociados a síndrome metabólico, incluyendo uno o más de obesidad abdominal, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión.  
55
33. La composición farmacéutica para uso de las reivindicaciones 28(e) o 32, que comprende además reducir el nivel de lipopolisacárido (LPS) bacteriano en el sujeto.
34. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 28(e) o (f), 32 o 33, en donde el  
60 sujeto necesita un cambio en el perfil lipídico de HDL/LDL.
35. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 28-34, en donde la composición farmacéutica comprende una proteína de fusión de IL-22 Fc que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 10.  
65
36. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 28-35, en donde se

coadministra al sujeto al menos un agente terapéutico adicional.

37. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 28-36, en donde la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal.

5 38. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de IL-22 Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 21-27, para su uso en un método de aceleración o mejora de la curación de heridas en un sujeto.

10 39. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 38, en donde la herida es una herida crónica o una herida infectada.

40. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 38-39, en donde el sujeto es diabético, en donde, opcionalmente, el sujeto diabético tiene diabetes de tipo II.

15 41. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 38-40, en donde la herida es una úlcera de pie diabético.

20 42. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 38-41, en donde la composición farmacéutica se administra hasta que haya un cierre completo de la herida.

43. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 38-42, en donde la proteína de fusión de IL-22 Fc comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 10.

25 44. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 38-43, en donde se coadministra al sujeto al menos un agente terapéutico adicional para acelerar o mejorar la curación de heridas.

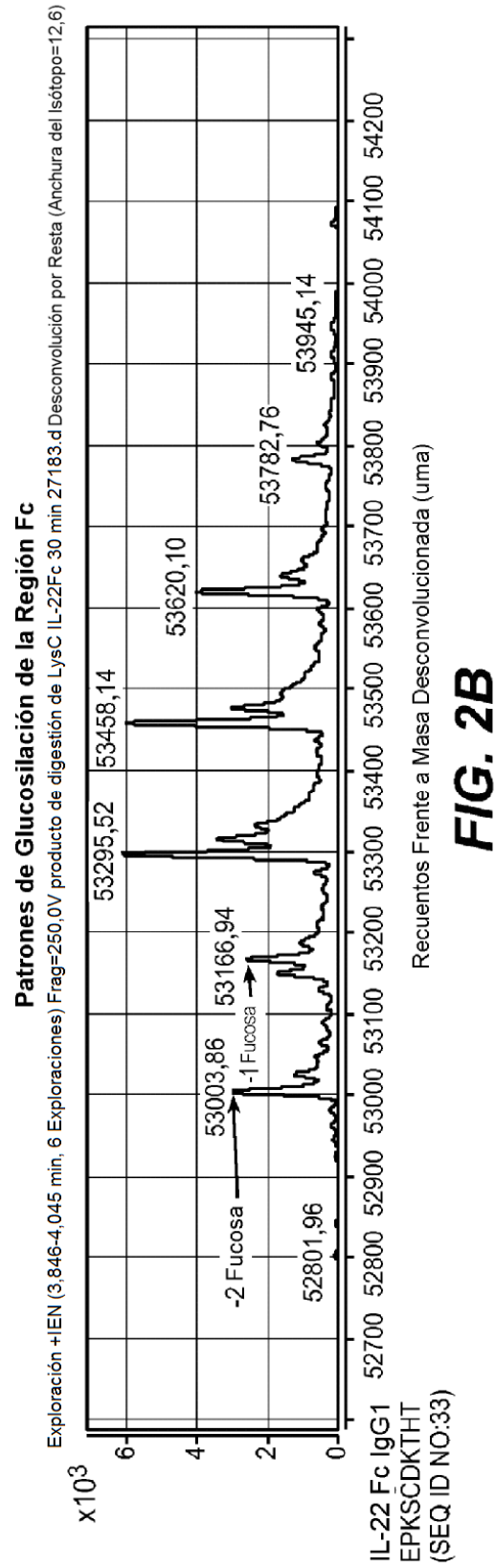
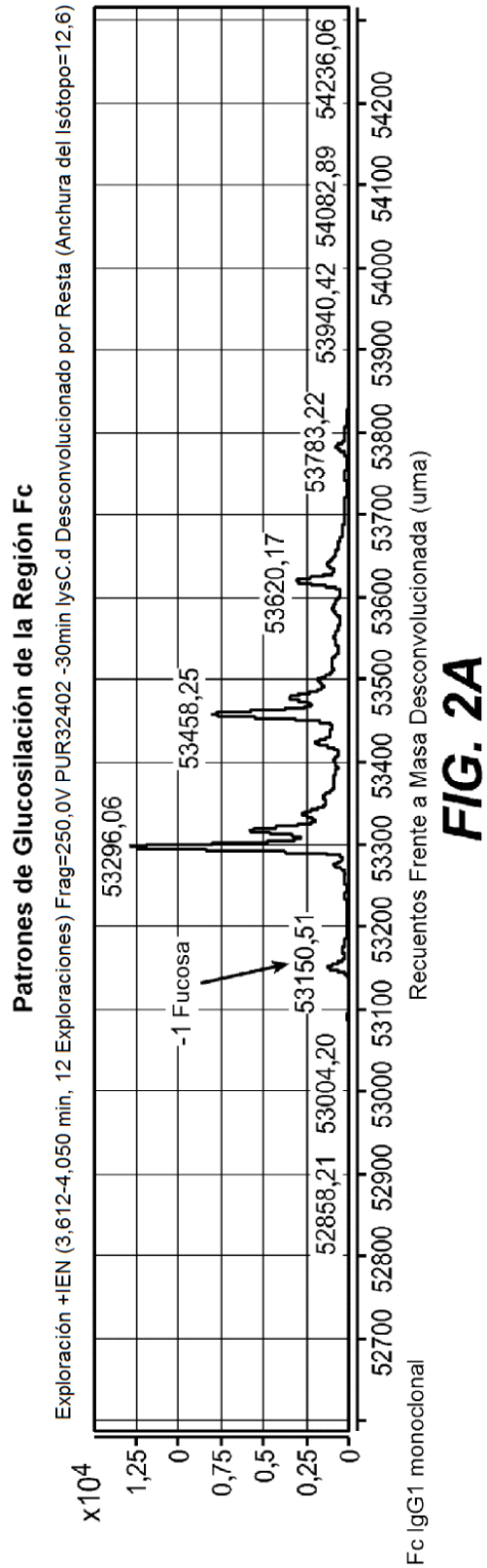
30 45. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 38-44, en donde la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o por vía tópica.

46. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 28-45, en donde el sujeto es un ser humano.

# Alineamiento de Secuencias de Aminoácidos de IL-22

|                          |                                                                 |                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|
| Ser humano (Q9GZX6)      | apisschrldksnfqqpyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvsmsercylmk    | 60                  |
| Chimpancé (XP_003313906) | apisschrldkssfqppyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvsmsercylmk    |                     |
| Orangután (XP_002823544) | apisschrldksnfqqpyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvsmsercylmk    |                     |
| Ratón (Q9JJY9)           | lpvntcrcklevsnfqppyivnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvmsakdqcyllmk |                     |
| Perro (XP_538274)        | lpisschrldksnfqqpyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvnmgercylml    |                     |
|                          | * * * * *                                                       | ***** **            |
| Ser humano (Q9GZX6)      | qvlntleevlfpqsdrfqymqevvpflarlsnrlstchiegddllhiqrnvqklkdtvk     | 120                 |
| Chimpancé (XP_003313906) | qvlntleevlfpqsdrfqymqevvpflarlsnrlstchiegddllhiqrnvqklkdtvk     |                     |
| Orangután (XP_002823544) | qvlntleevlfpqsdrfqymqevvpflarlsnrlstchiegddllhiqrnvqklkdtvk     |                     |
| Ratón (Q9JJY9)           | qvlntleedvllpqsdrrfqymqevvpfltklsnqlsschisgdddnigknvrrlketvk    |                     |
| Perro (XP_538274)        | evlntleevllpqsdrrfqymqevvpflarlsnklsqchiendddghiqrnvqklkdtvq    |                     |
|                          | ***** ** *****                                                  | *** ** *** ** ** ** |
| Ser humano (Q9GZX6)      | klgesgeikaigeldllfmslrnaci                                      | 146 (SEQ ID NO:4)   |
| Chimpancé (XP_003313906) | klgengeikaigeldllfmslrnaci                                      | (SEQ ID NO:48)      |
| Orangután (XP_002823544) | klgesgeikaigeldllfmslrnaci                                      | (SEQ ID NO:49)      |
| Ratón (Q9JJY9)           | klgesgeikaigeldllfmslrnacv                                      | (SEQ ID NO:50)      |
| Perro (XP_538274)        | klgengeikaigeldllfmalrnacv                                      | (SEQ ID NO:51)      |
|                          | **** *****                                                      | *****               |

FIG. 1



Patrones de Glucosilación de la Región Fc

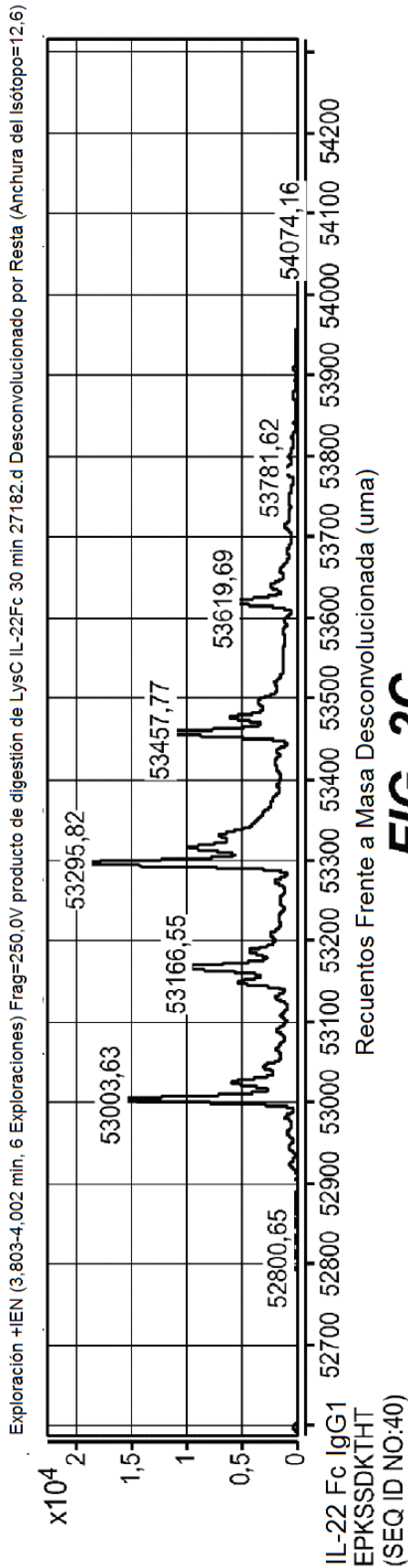


FIG. 2C

Patrones de Glucosilación de la Región Fc

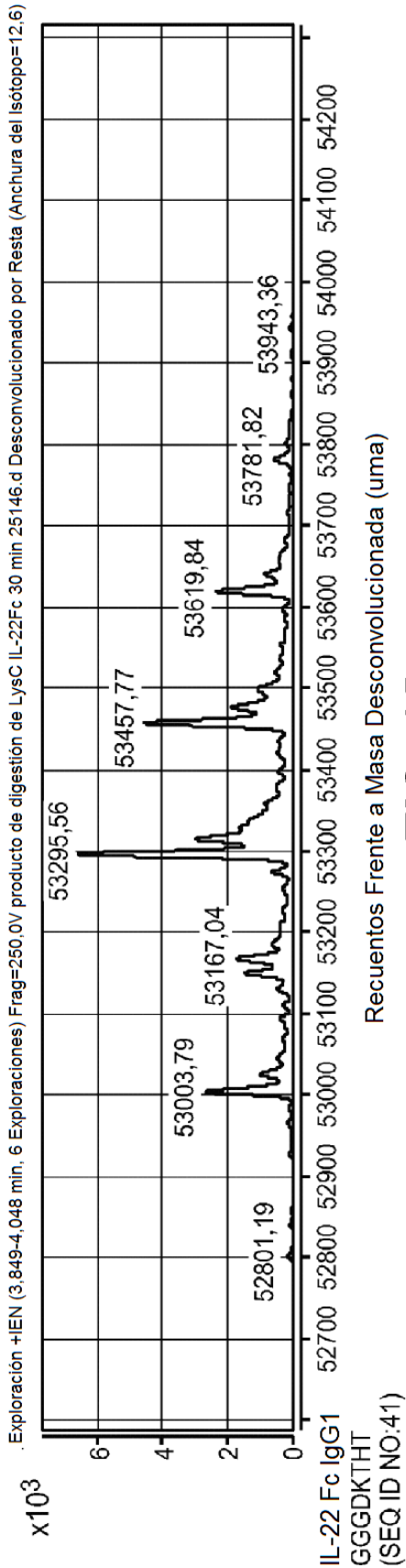


FIG. 2D

Patrones de Glucosilación de la Región Fc

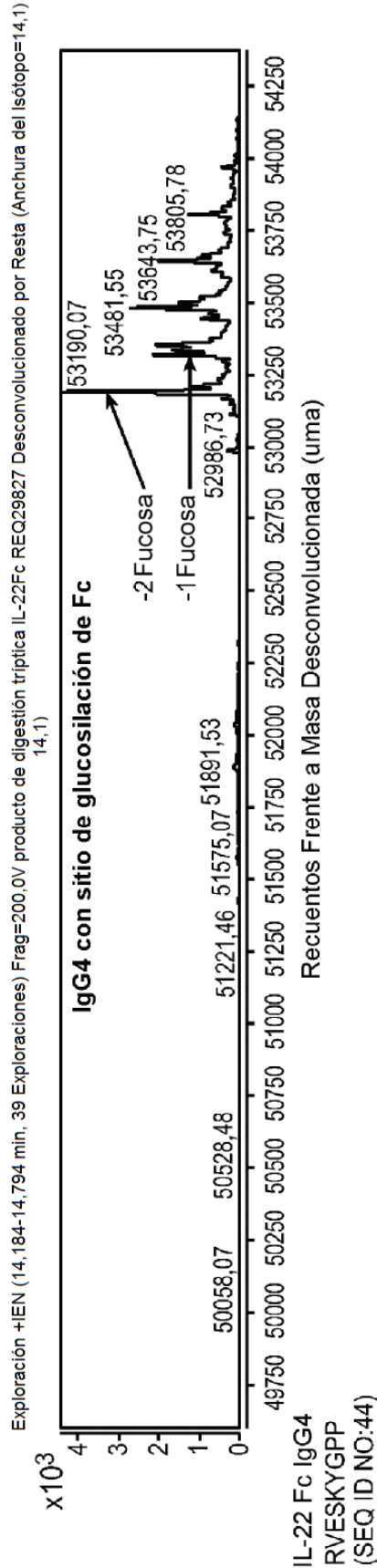


FIG. 2E

Patrones de Glucosilación de la Región Fc

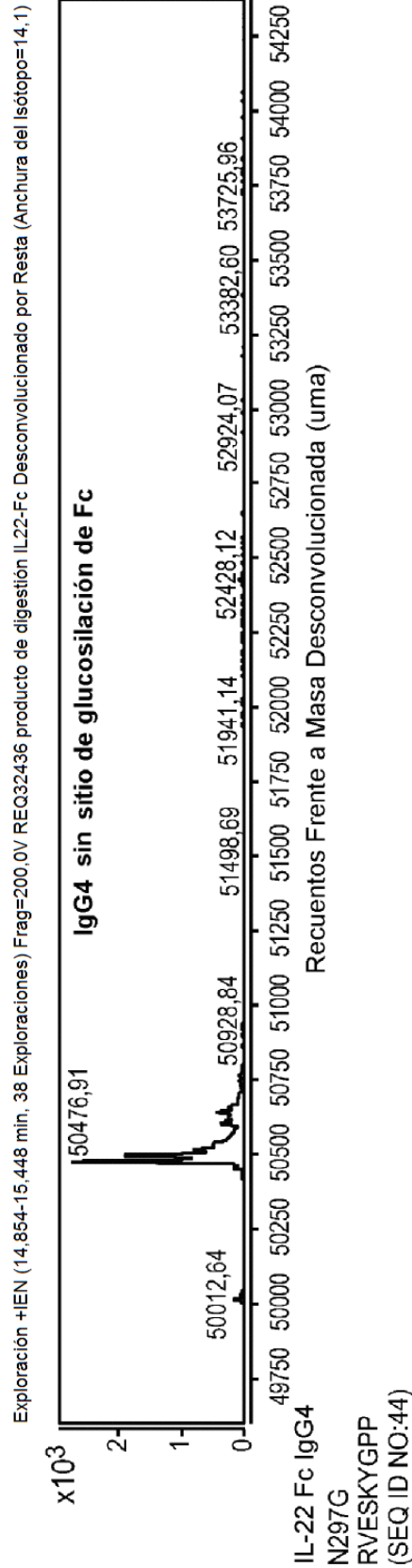


FIG. 2F

Patrones de Glucosilación de la Región Fc

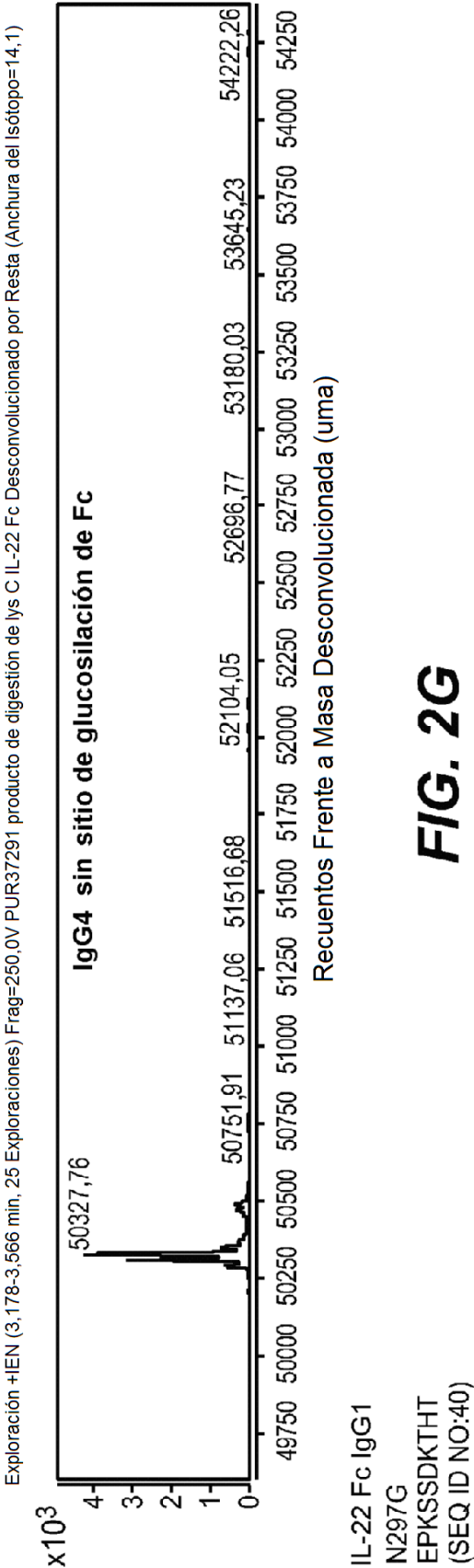


FIG. 2G

|               |  |                            |     |
|---------------|--|----------------------------|-----|
| <b>FIG. 3</b> |  | [Extremo N Maduro de IL-22 |     |
|               |  | IL-22 IgG4 Fc              | 50  |
|               |  | IL-22 IgG1 Fc              | 50  |
|               |  | IL-22                      | 50  |
|               |  | IL-22 IgG4 Fc              | 100 |
|               |  | IL-22 IgG1 Fc              | 100 |
|               |  | IL-22                      | 100 |
|               |  | IL-22 IgG4 Fc              | 150 |
|               |  | IL-22 IgG1 Fc              | 150 |
|               |  | IL-22                      | 146 |
|               |  | IL-22 IgG4 Fc              | 199 |
|               |  | IL-22 IgG1 Fc              | 200 |
|               |  | IL-22 IgG4 Fc              | 249 |
|               |  | IL-22 IgG1 Fc              | 250 |
|               |  | IL-22 IgG4 Fc              | 299 |
|               |  | IL-22 IgG1 Fc              | 300 |
|               |  | IL-22 IgG4 Fc              | 349 |
|               |  | IL-22 IgG1 Fc              | 350 |
|               |  | IL-22 IgG4 Fc              | 377 |
|               |  | IL-22 IgG1 Fc              | 378 |

FIG. 3

IL-22 Fc IgG1 e IgG4 tienen Actividad *in Vitro* Similar

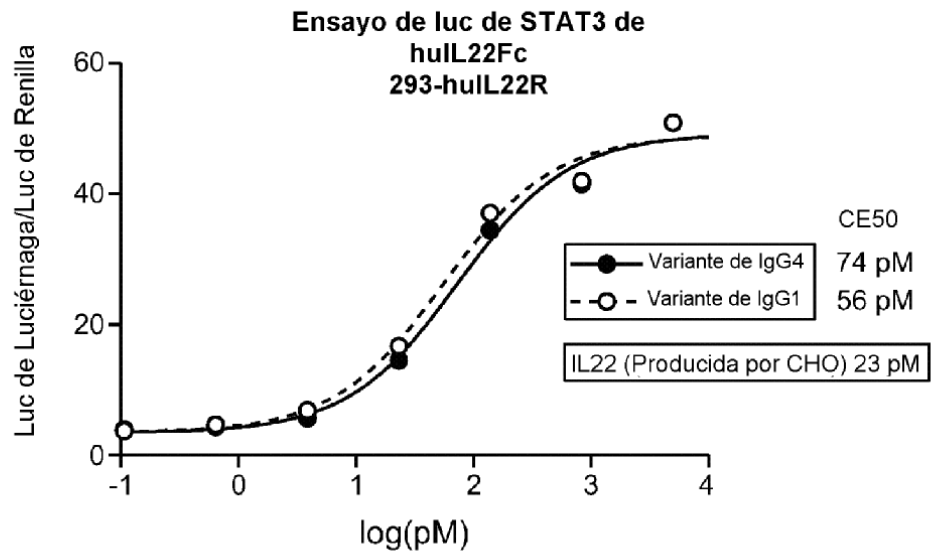


**FIG. 4**

Efectos Terapéuticos de IL-22 Fc en el Modelo de DSS de EII

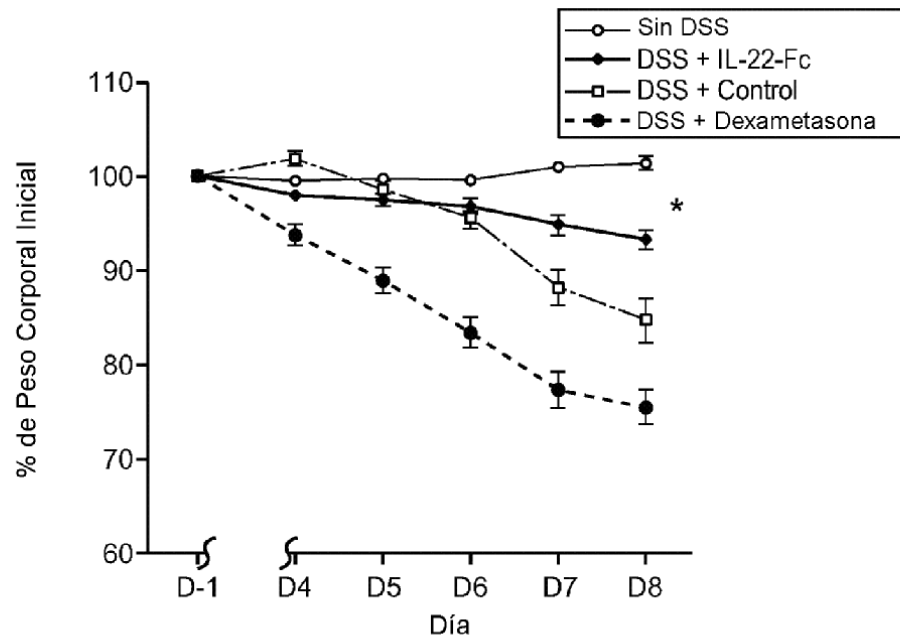


**FIG. 5A**

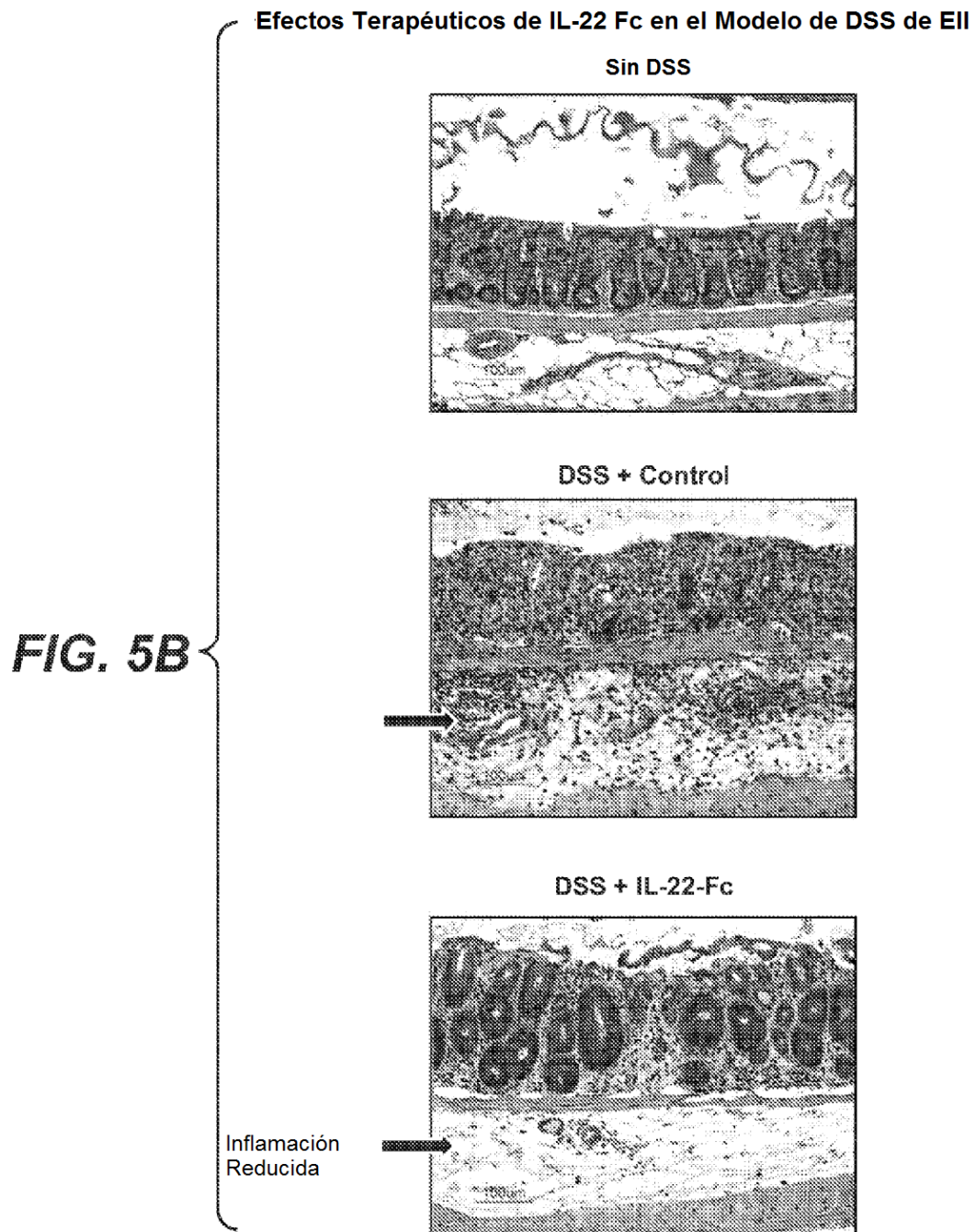


**FIG. 5C**

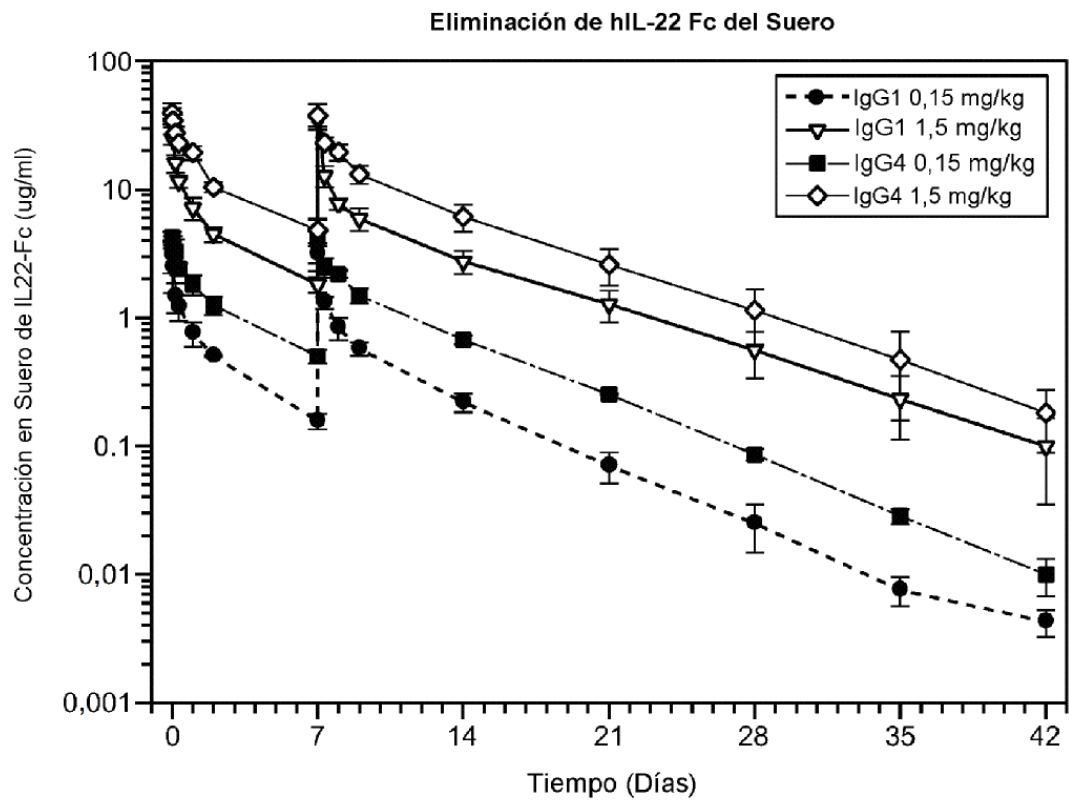
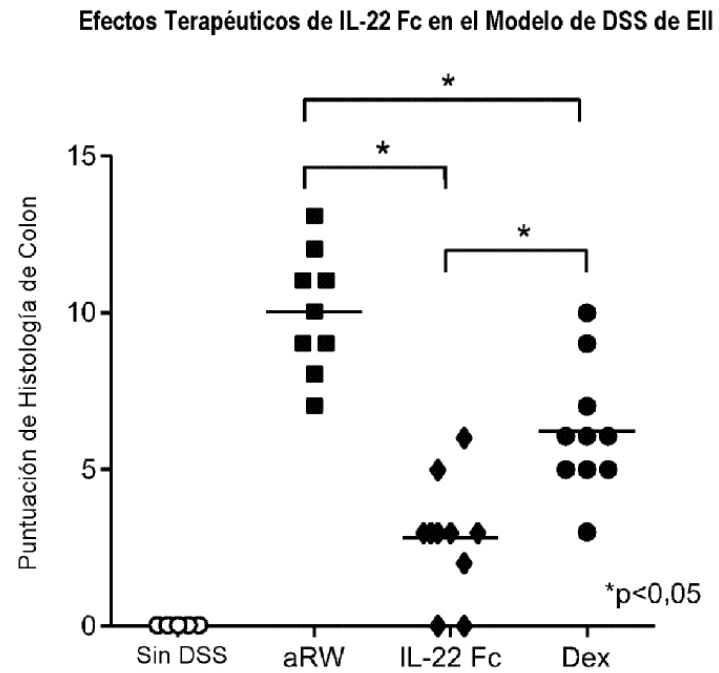


**FIG. 6**

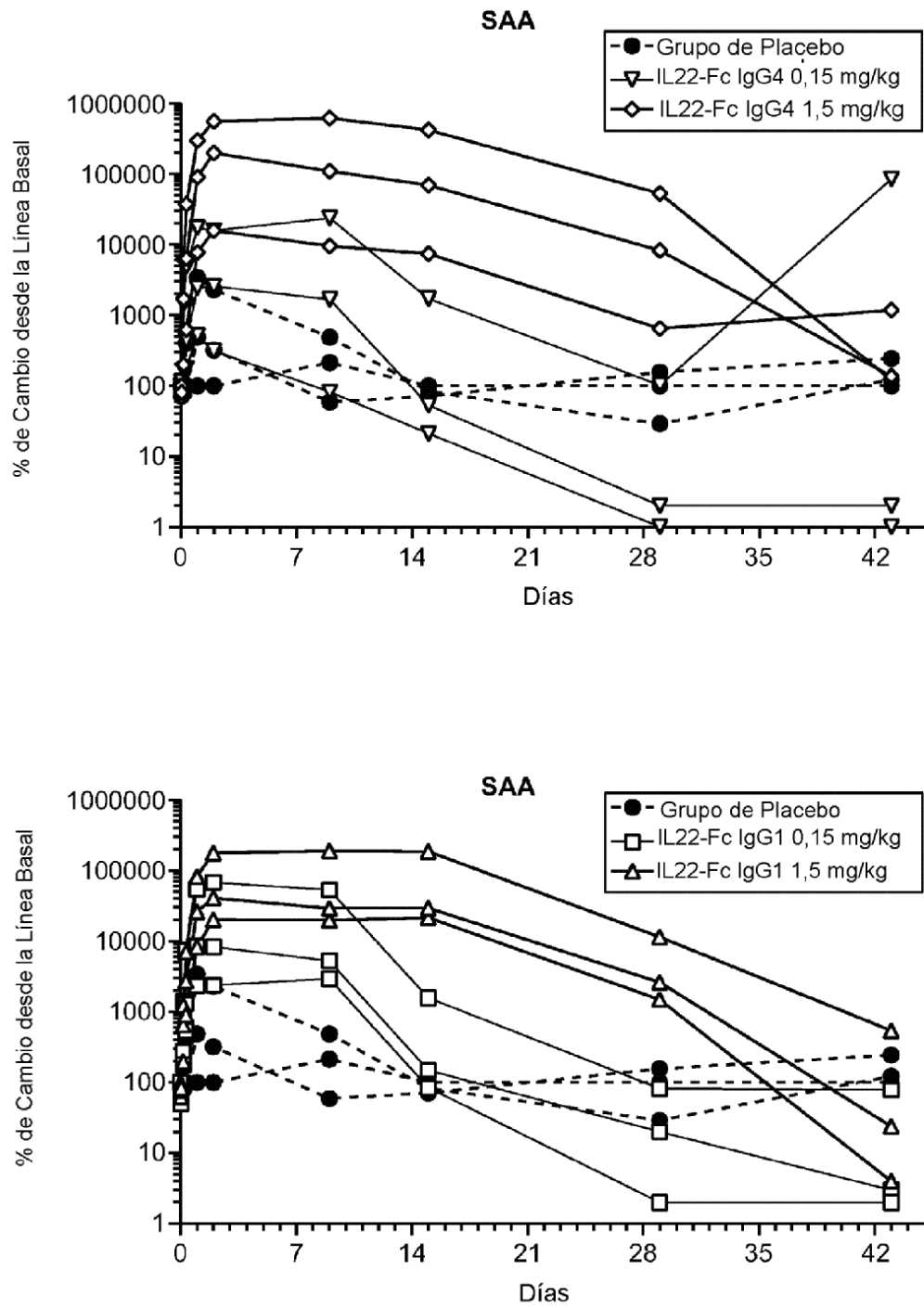


**FIG. 7A**

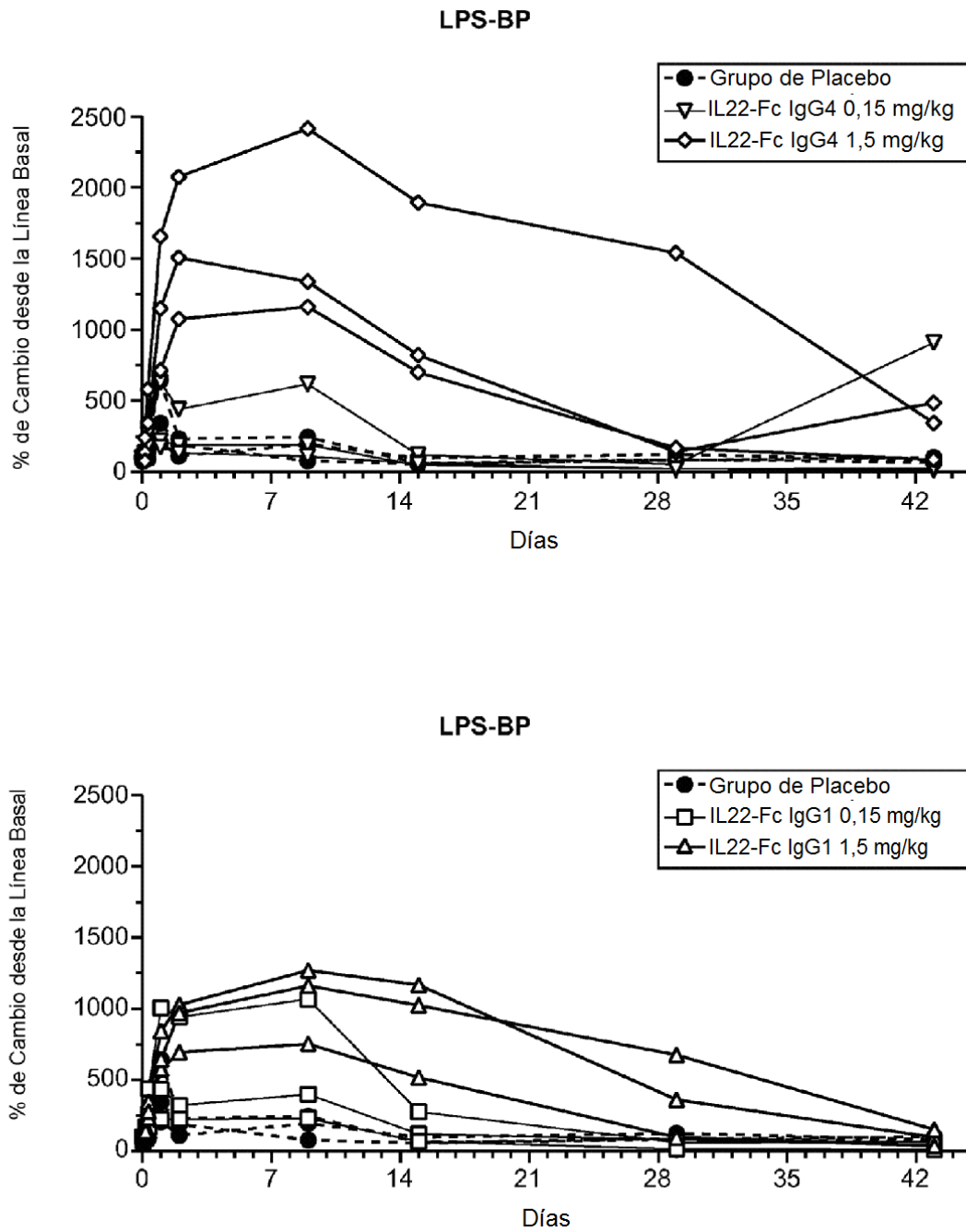


**FIG. 7B**

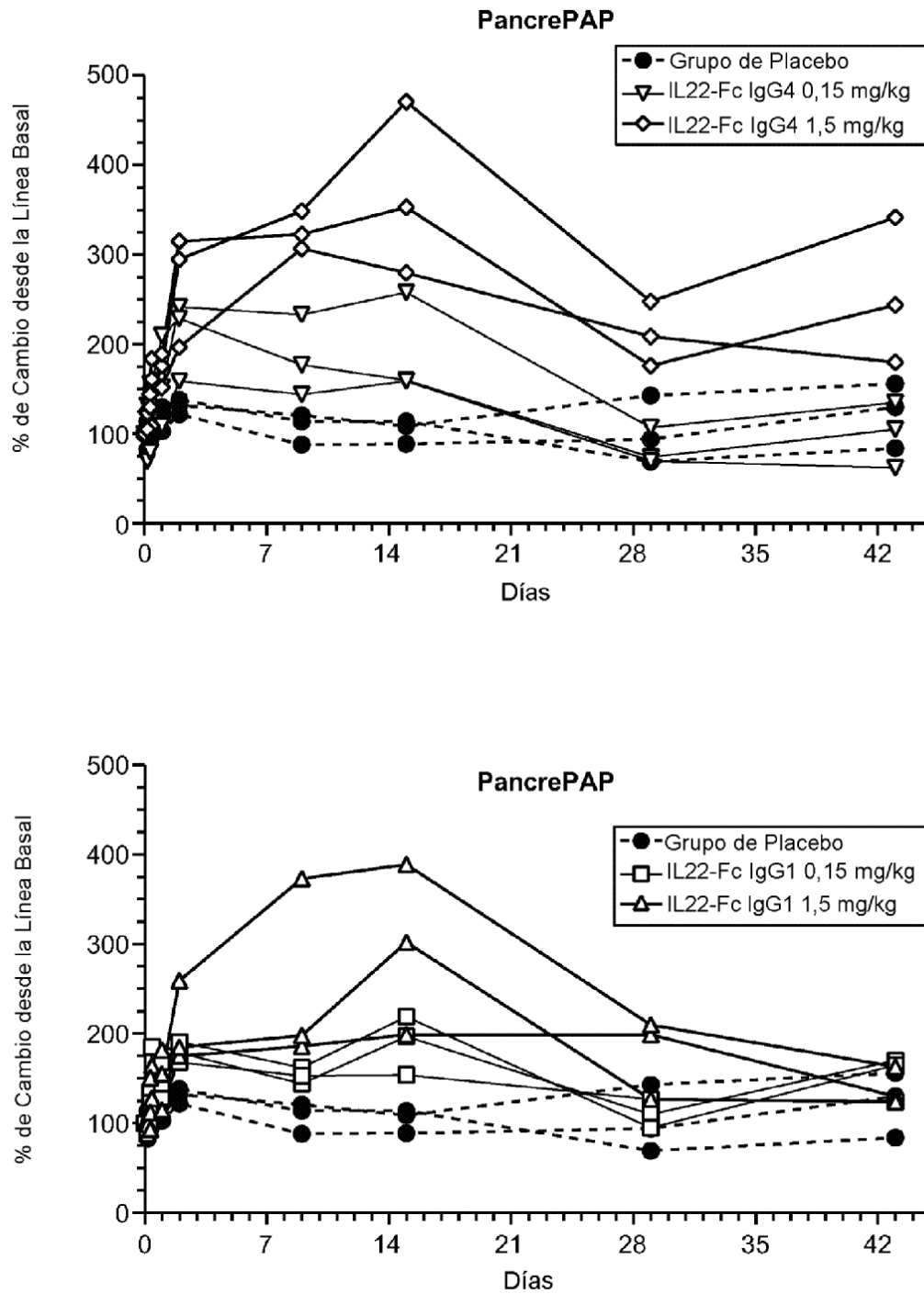


**FIG. 7C**

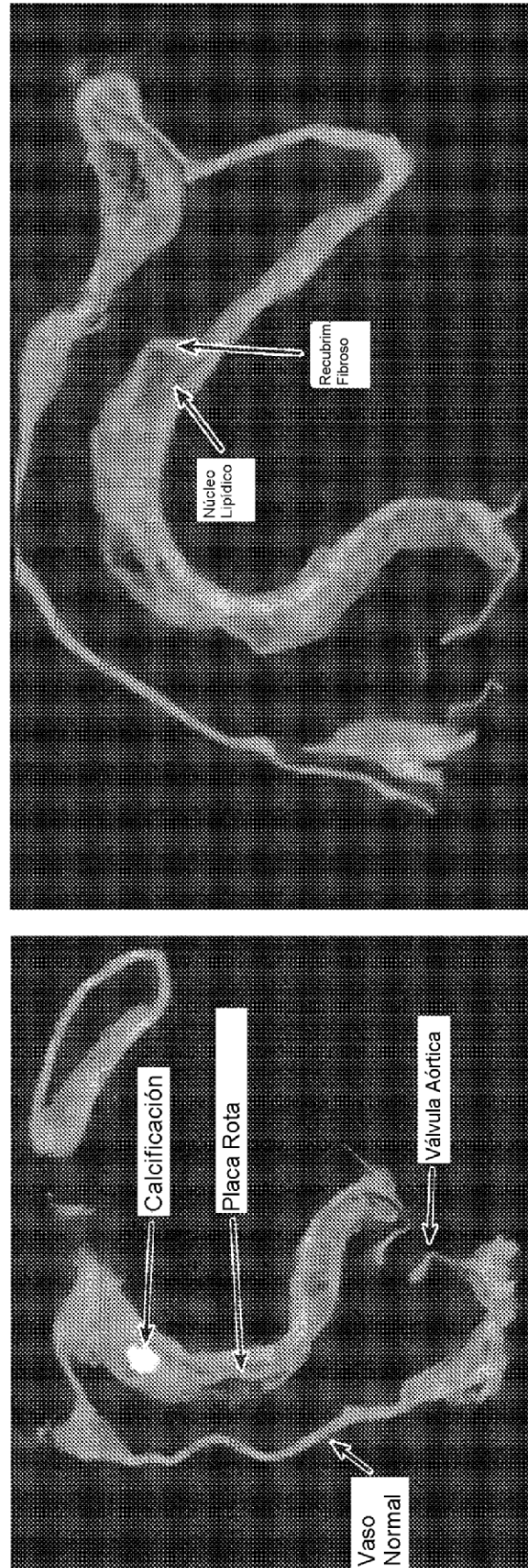


**FIG. 8**

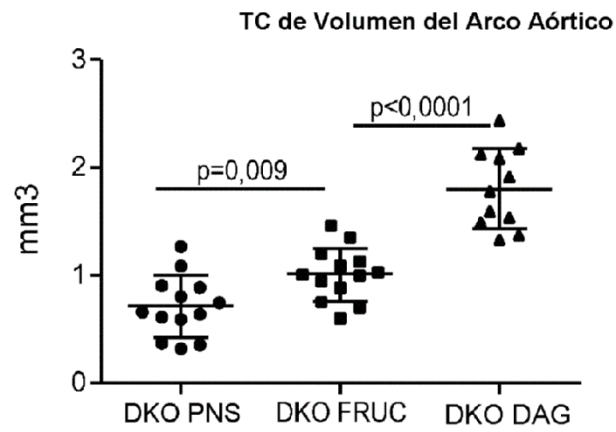


**FIG. 9A**

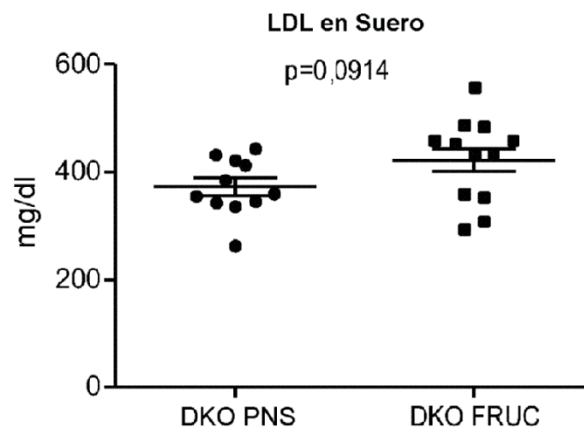


**FIG. 9B**

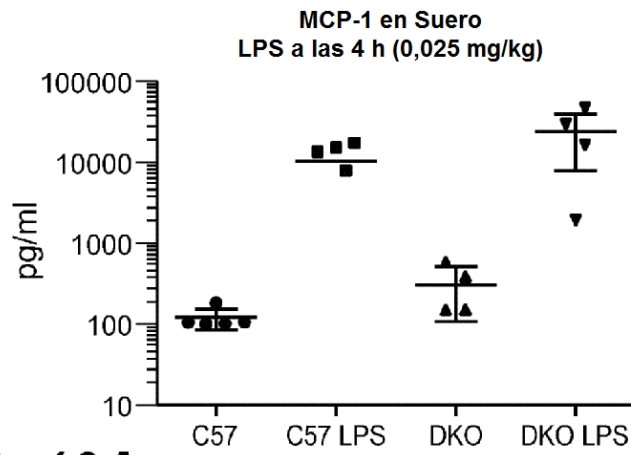


**FIG. 10A**

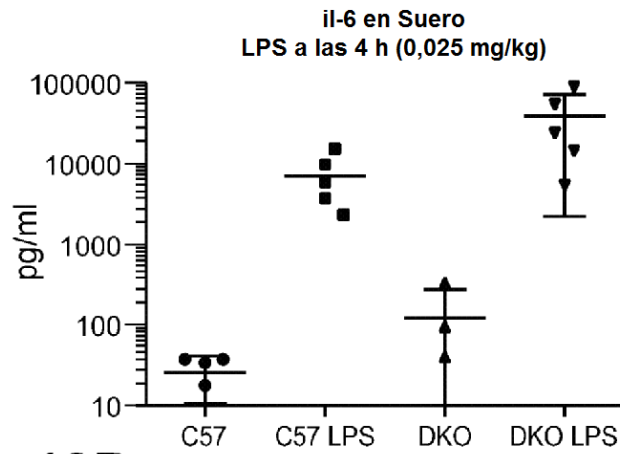


**FIG. 10B**

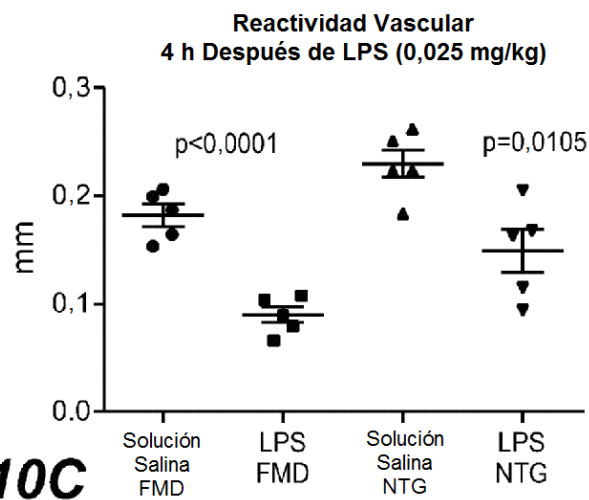


**FIG. 10C**

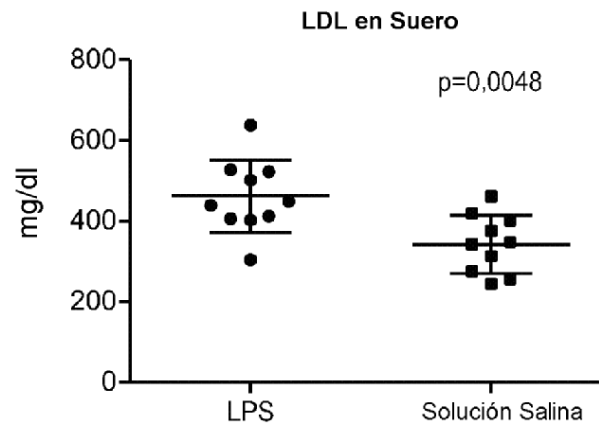


**FIG. 11A**

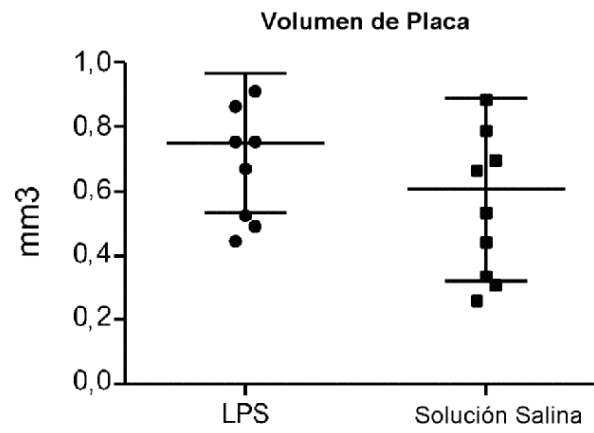


**FIG. 11B**

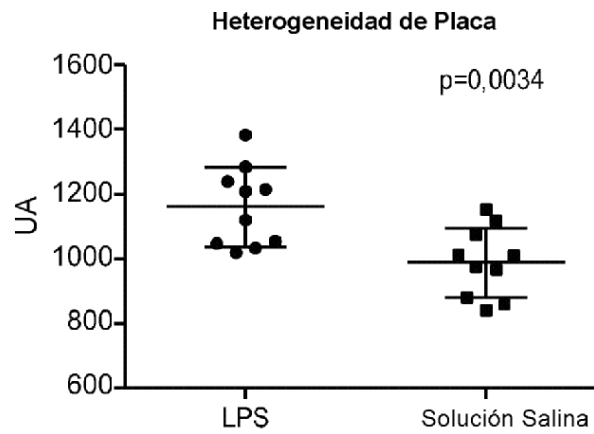


**FIG. 11C**

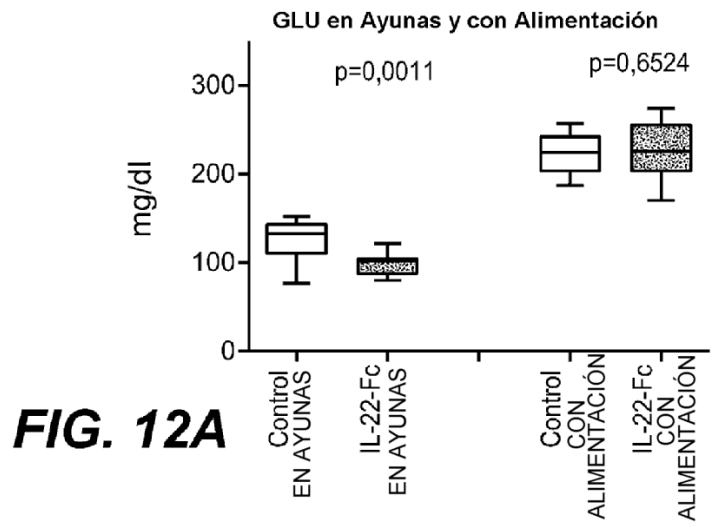


**FIG. 12A**

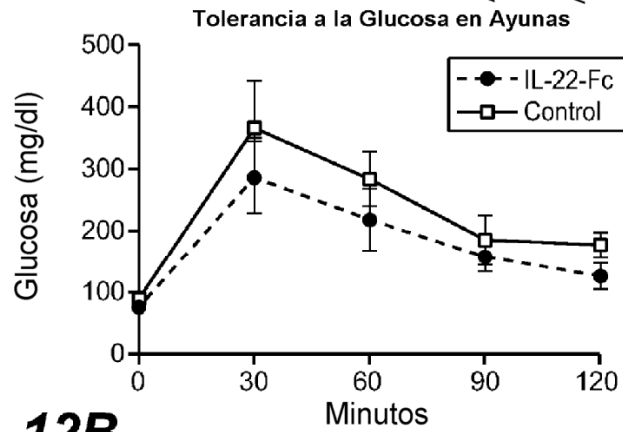


**FIG. 12B**

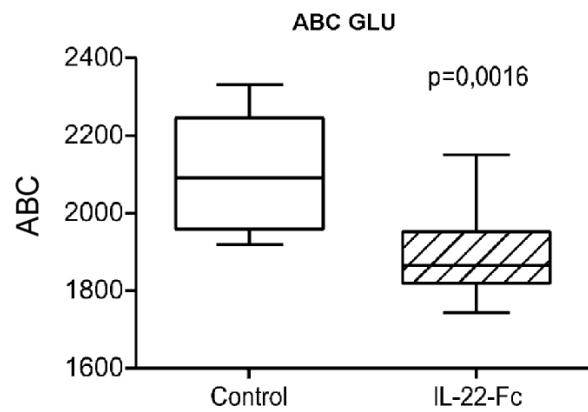
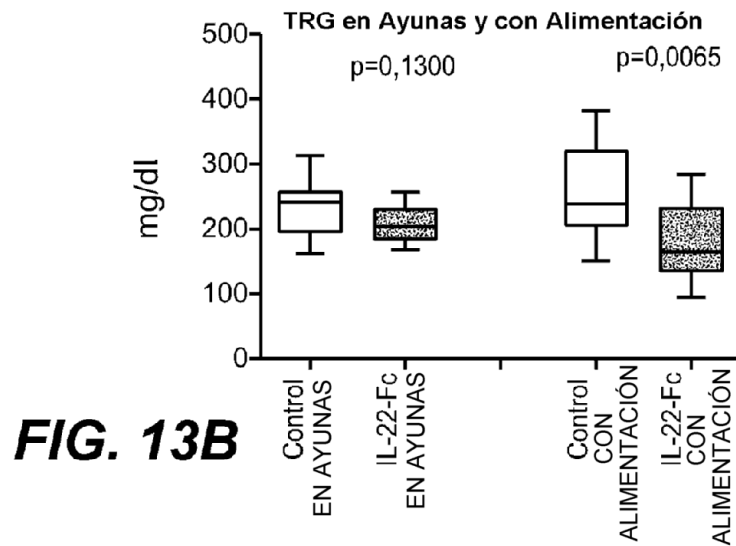
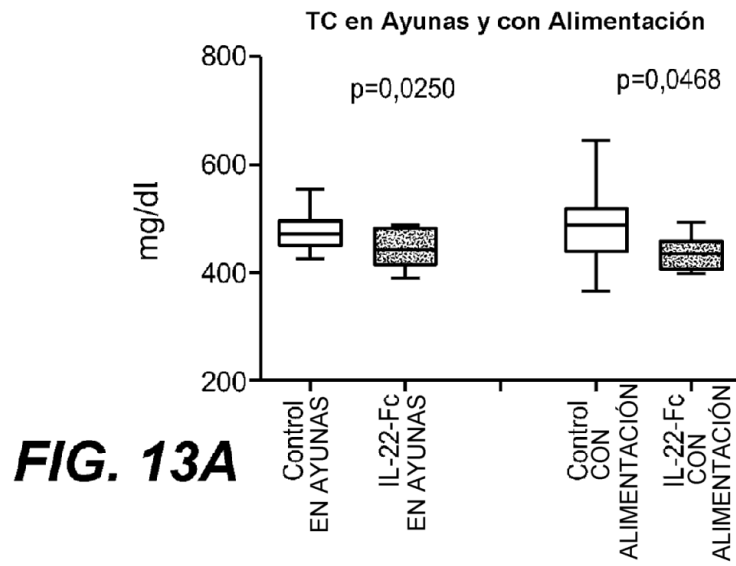
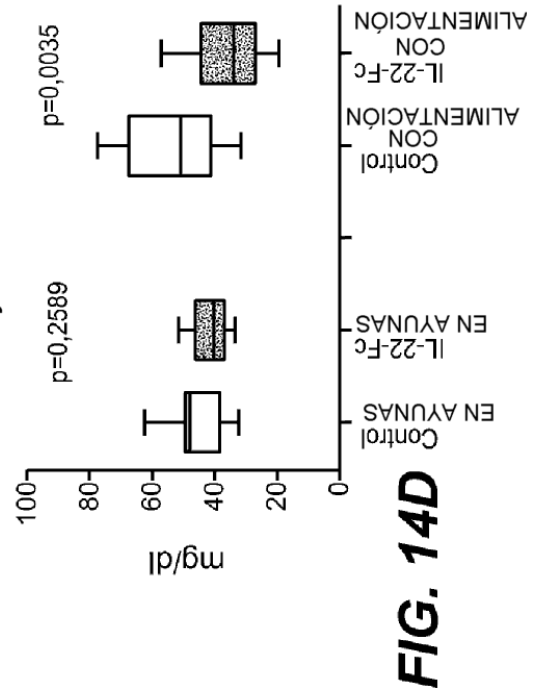
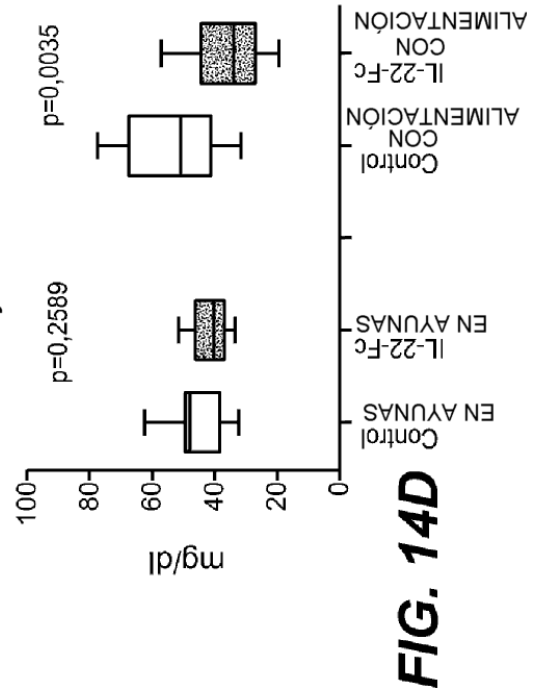
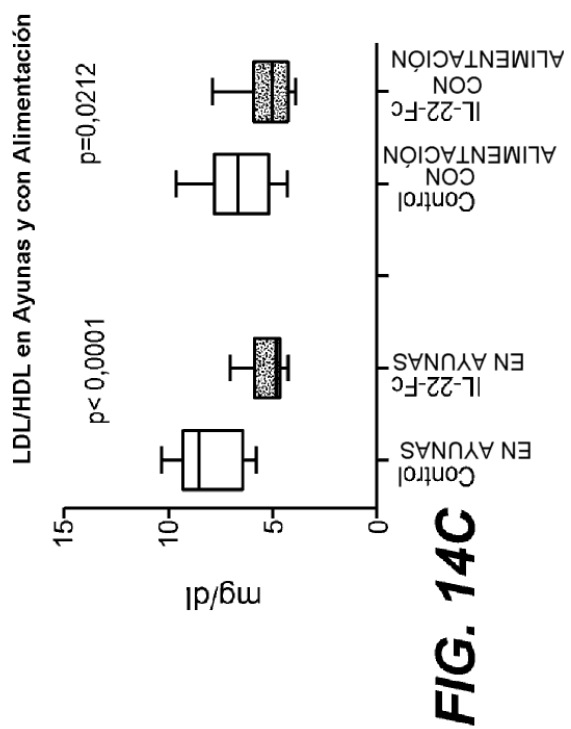
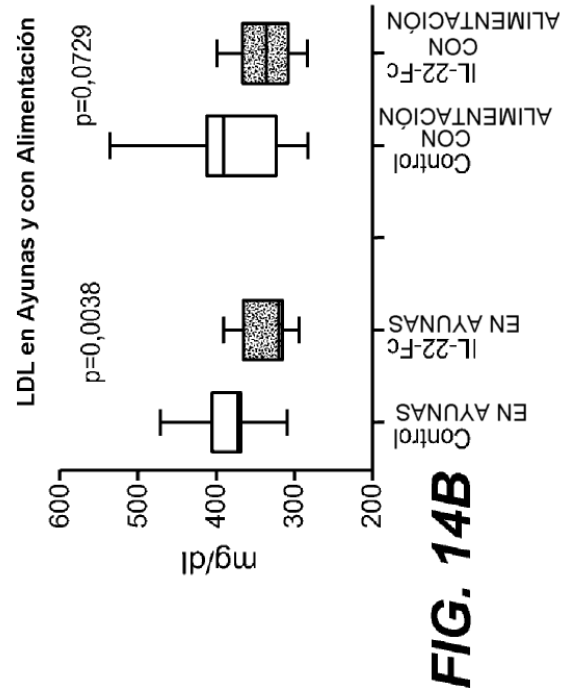


**FIG. 12C**





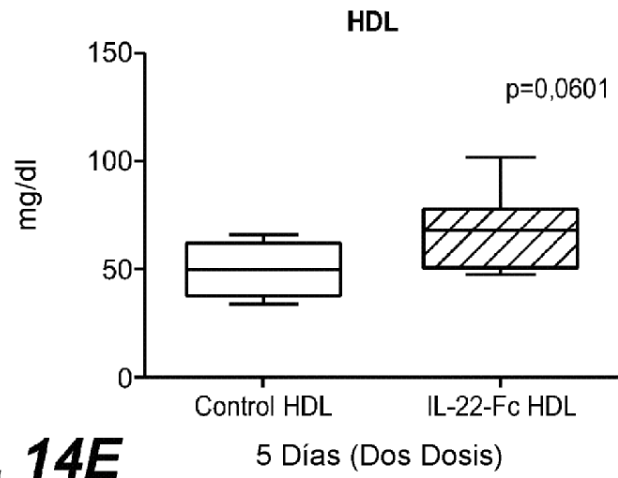


**FIG. 14E**

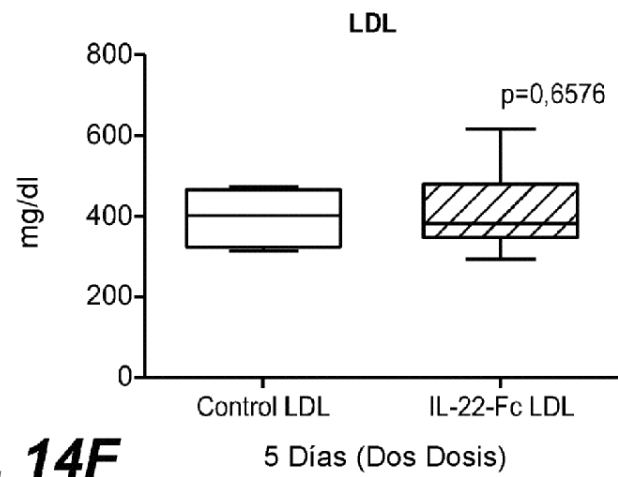


**FIG. 14F**

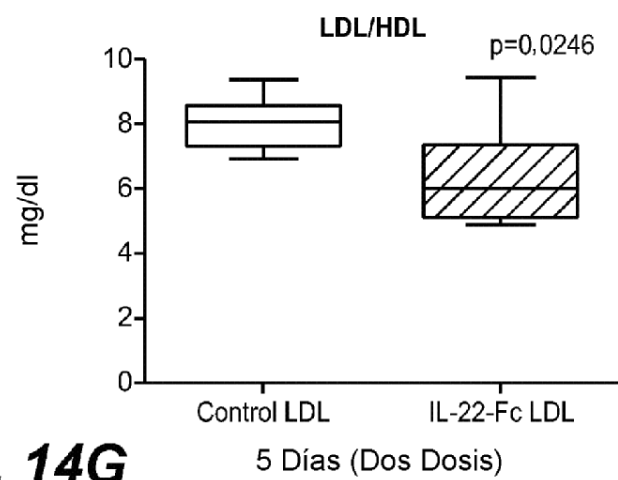


**FIG. 14G**

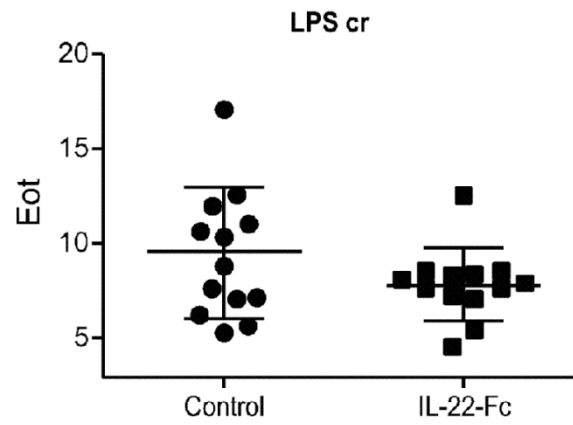


**FIG. 15**

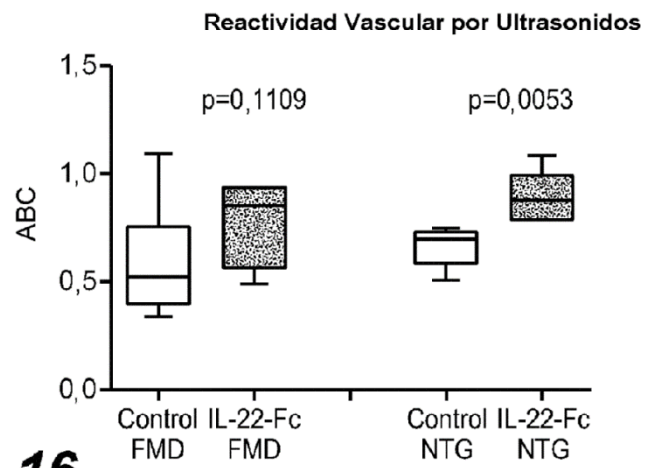


**FIG. 16**

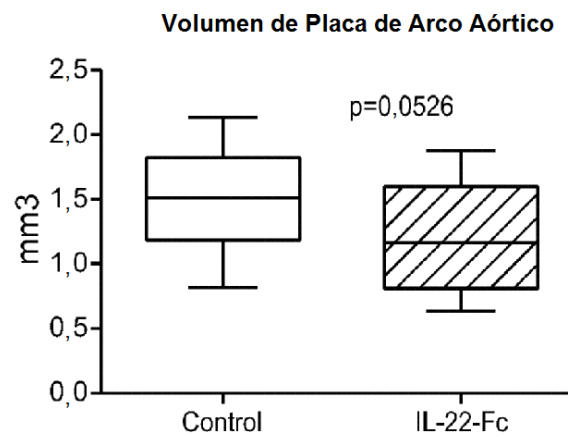


**FIG. 17A**

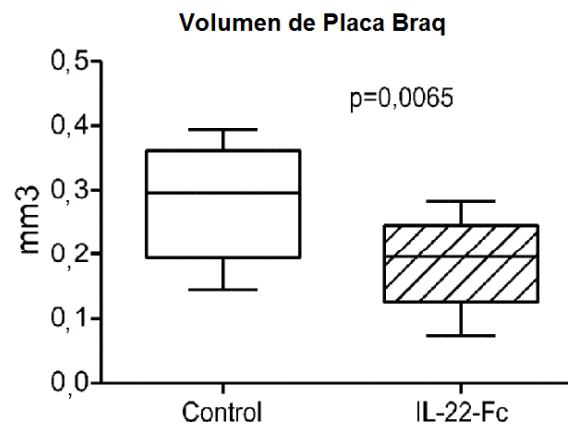


**FIG. 17B**

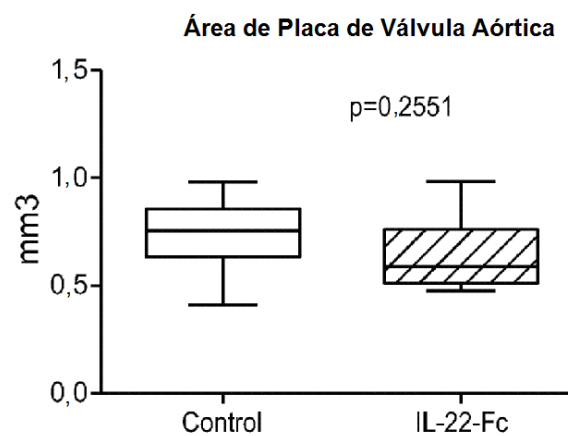
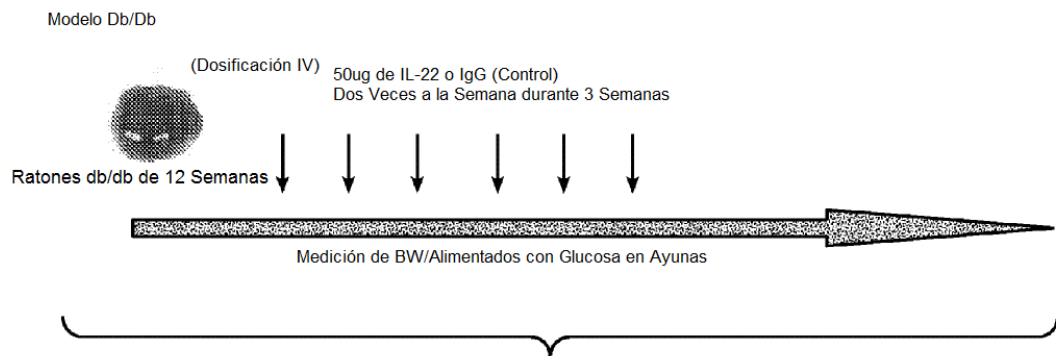
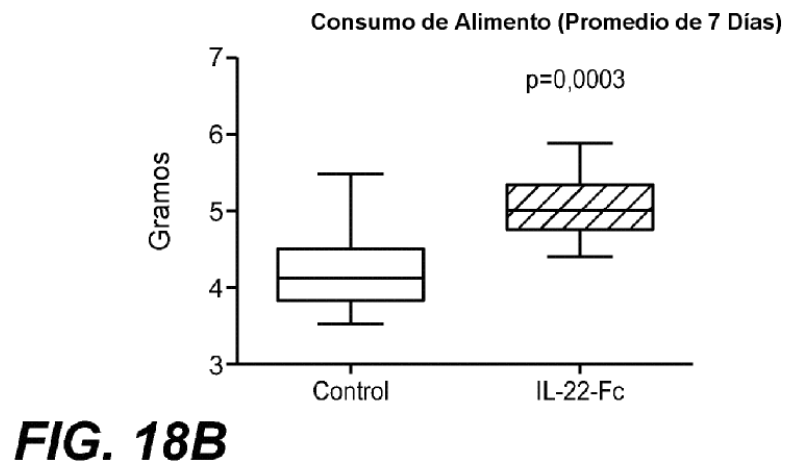
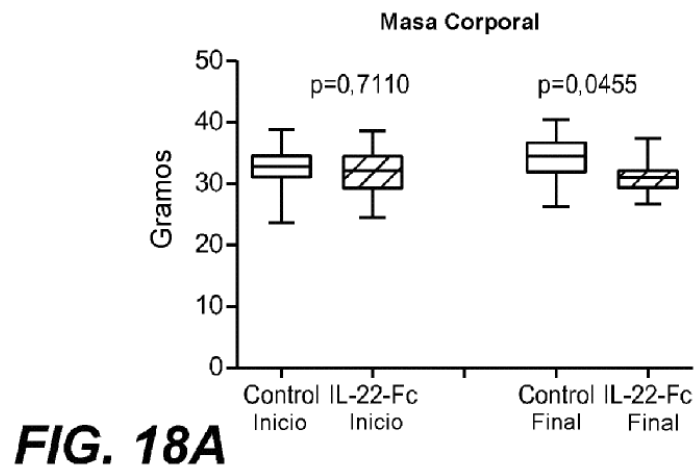


**FIG. 17C**



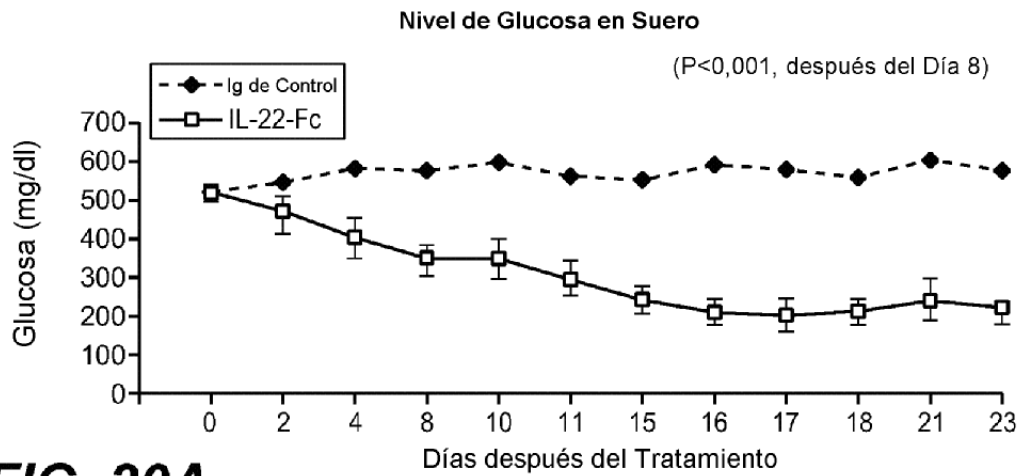


**FIG. 20A**

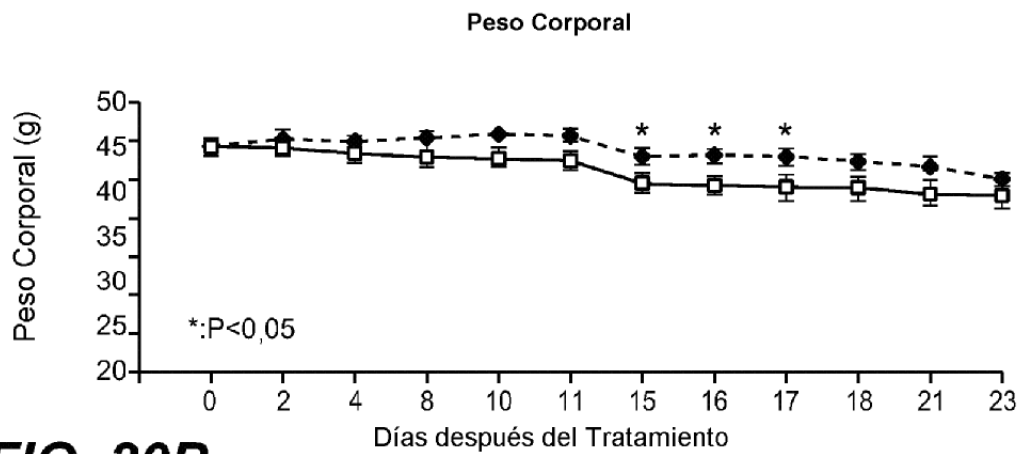


**FIG. 20B**

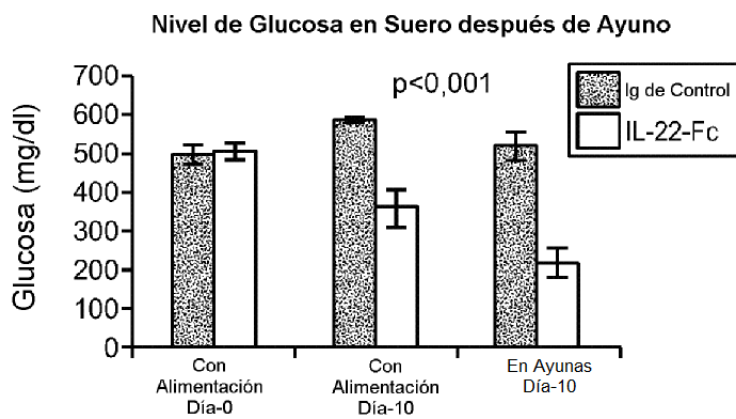


**FIG. 20C**

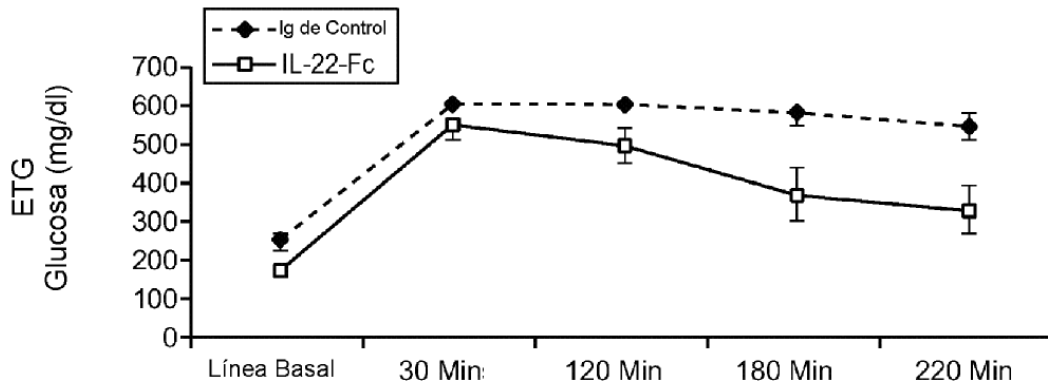


**FIG. 21**

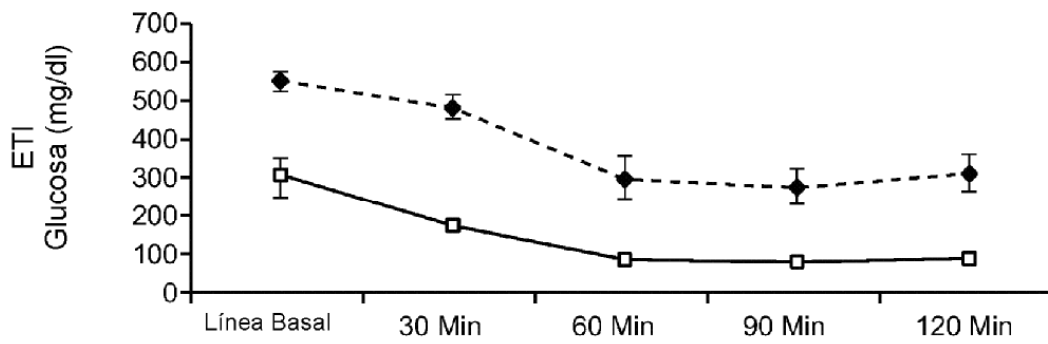


**FIG. 22A**

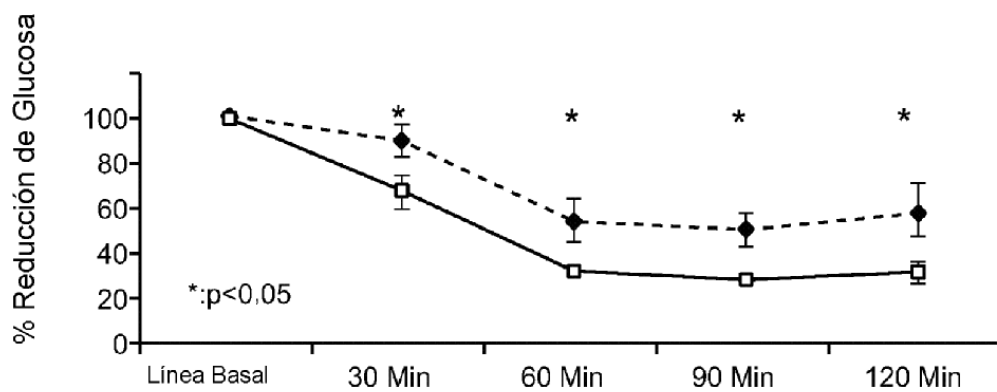


**FIG. 22B**

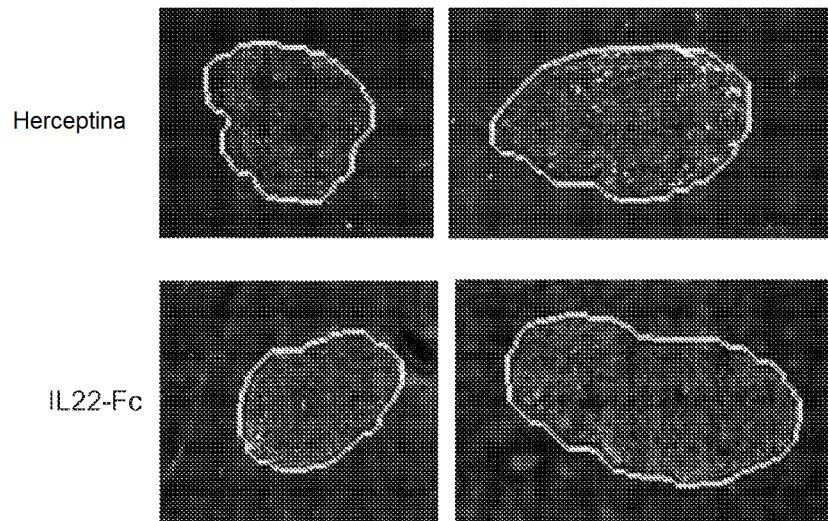


***FIG. 23A***

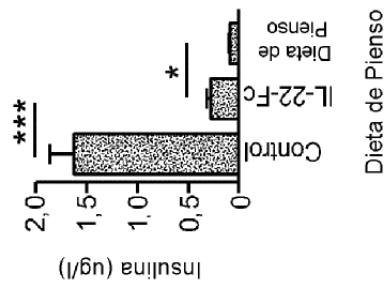


**FIG. 23D**

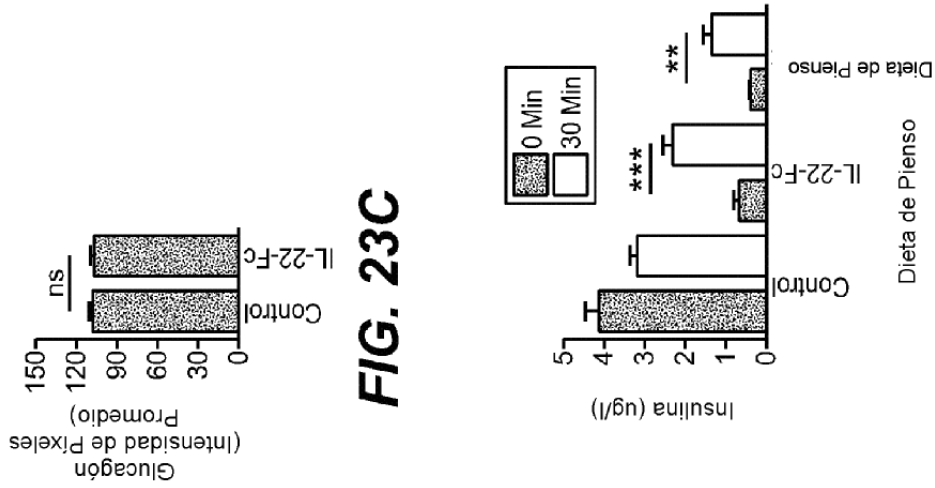


**FIG. 23F**

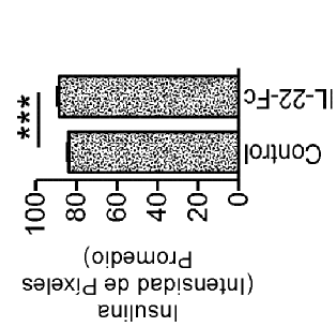


**FIG. 23B**

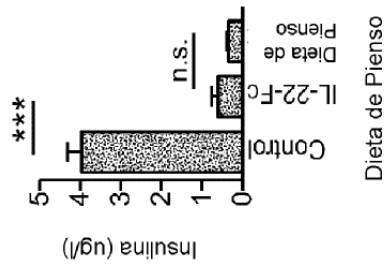


**FIG. 23E**

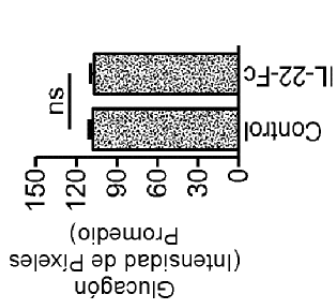


**FIG. 23C**

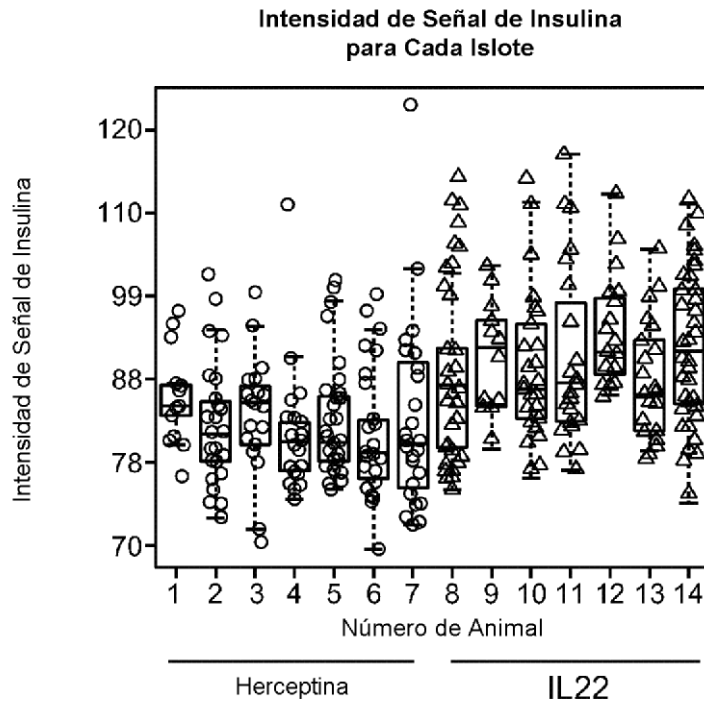


**FIG. 24A**

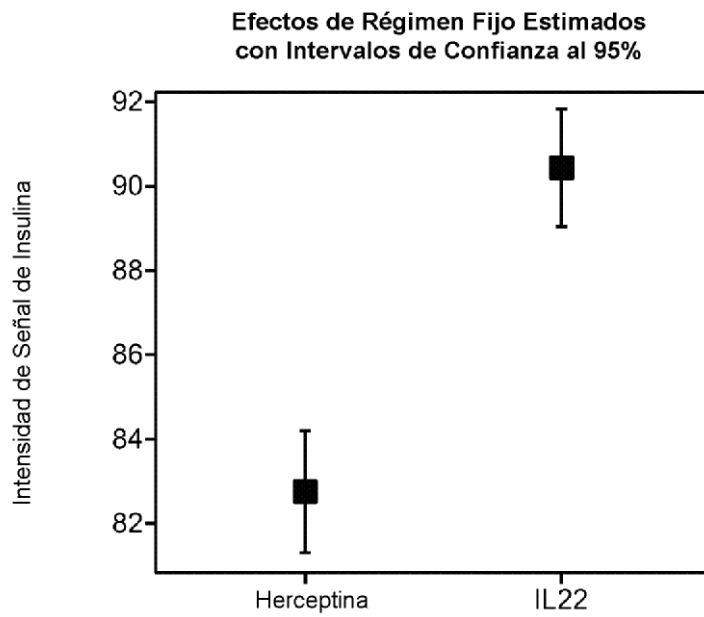


**FIG. 24B**

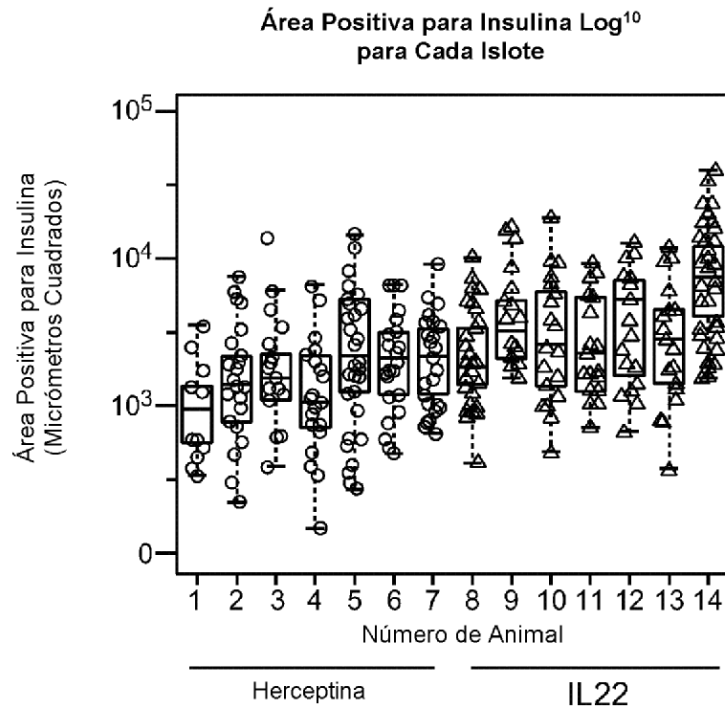


**FIG. 25A**

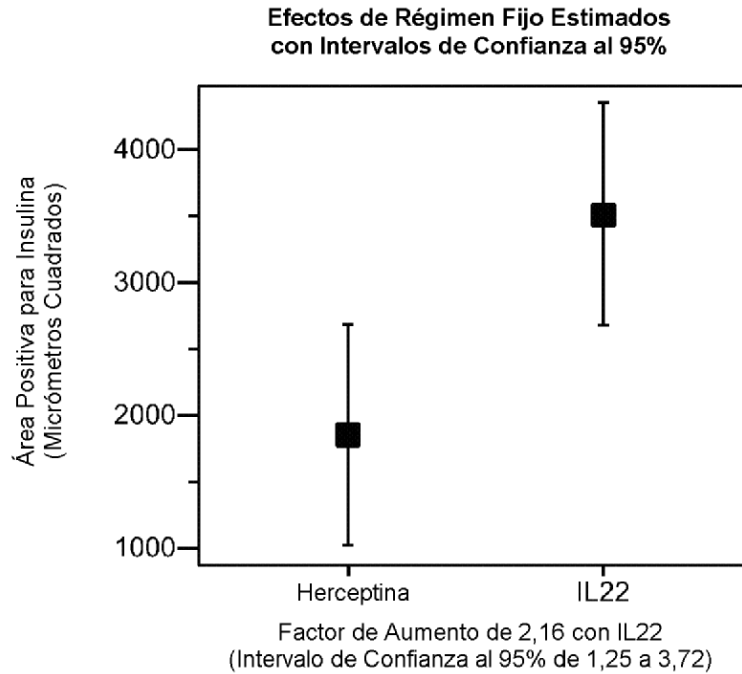


**FIG. 25B**

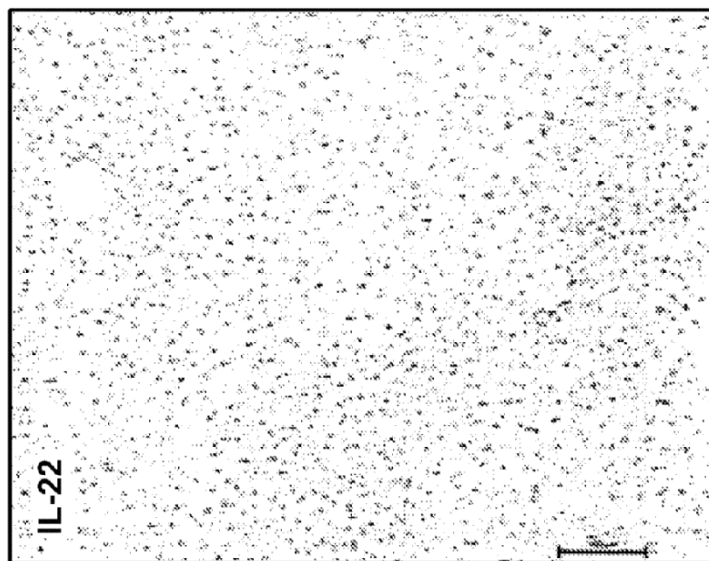


**FIG. 26B**

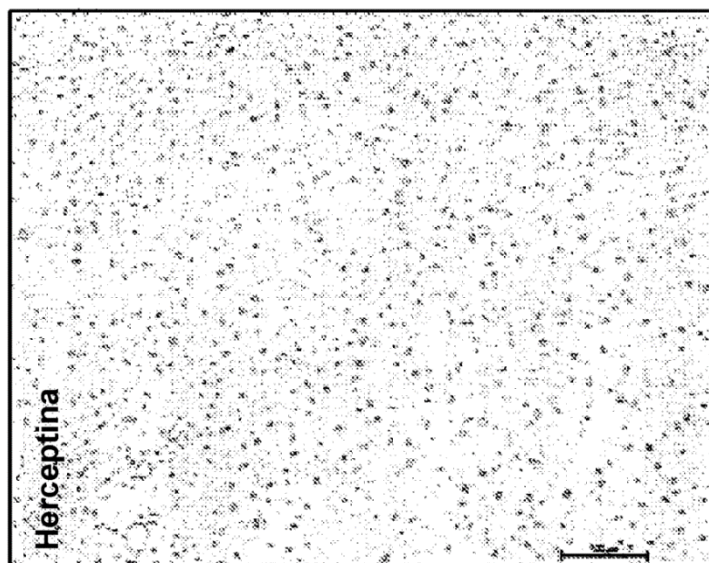


**FIG. 26A**

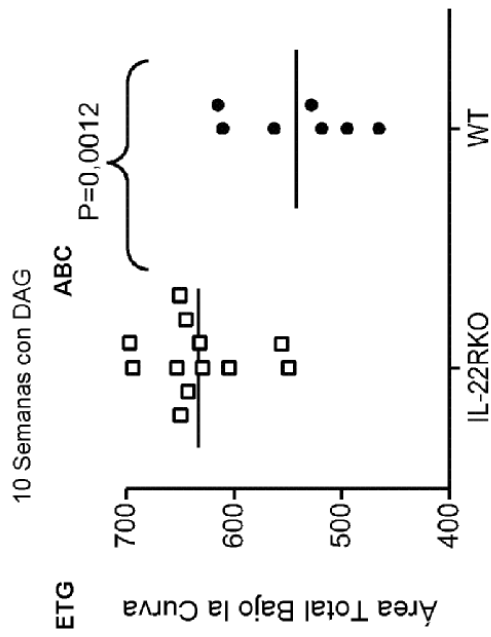


**FIG. 27B**

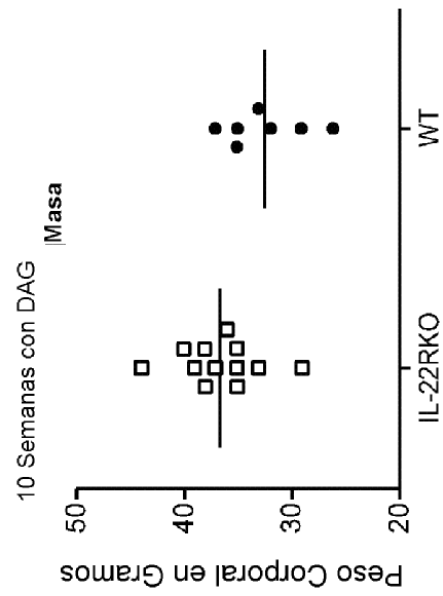


**FIG. 28**

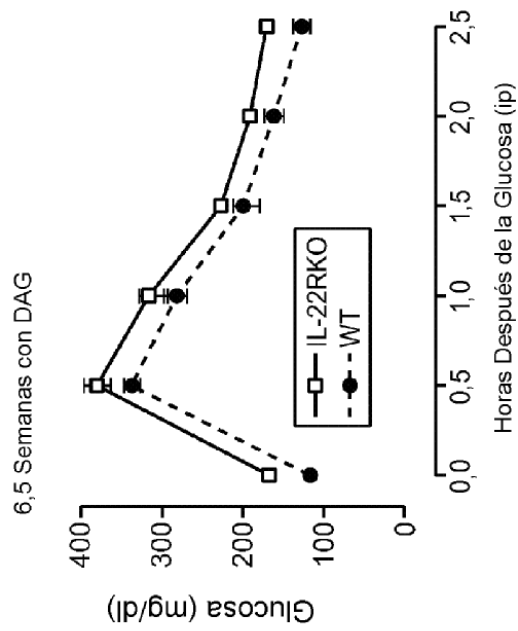


**FIG. 27A**

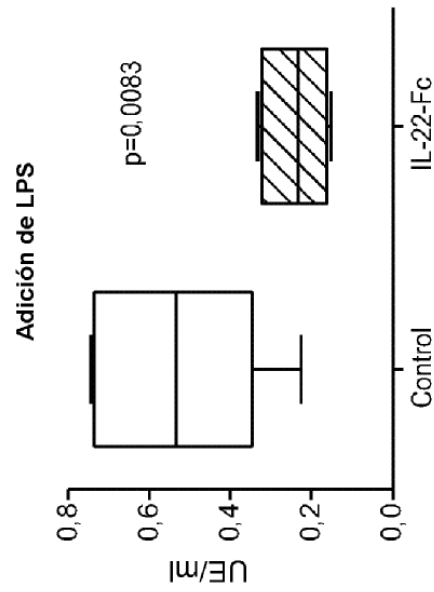


**FIG. 29A**

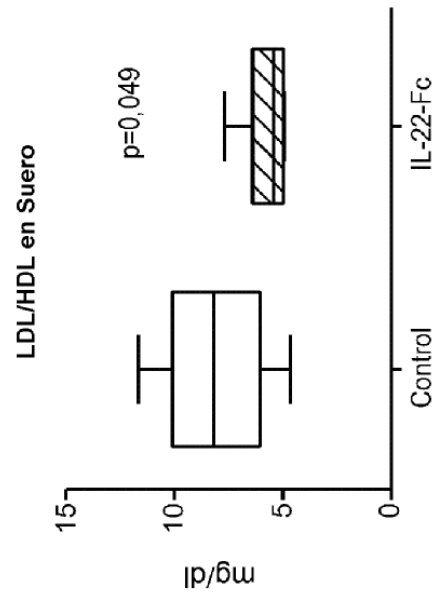


**FIG. 29D**

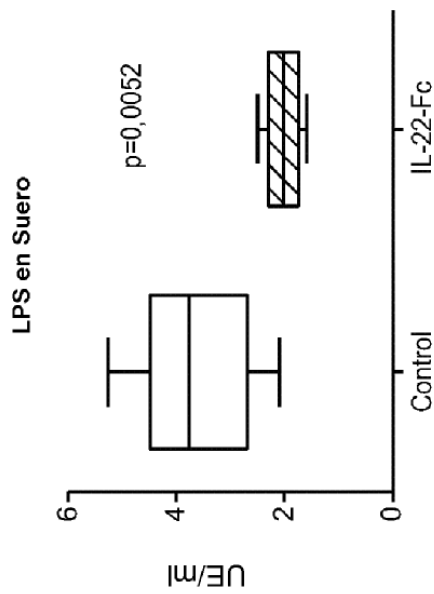


**FIG. 29B**

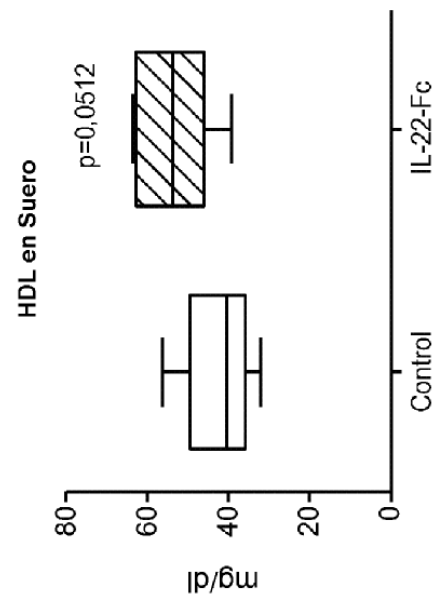


**FIG. 29C**

CTTCAGAACAGGTTCTCCTTCCCCAGTCACCAGTTGCTCGAGTTAGAATTGTCTGCAATGGCCGCCC  
TGCAGAAATCTGTGAGCTCTTTCCTTATGGGGACCCCTGGCCACCAGCTGCCTCCTTCTCTTGGCCCT  
CTTGGTACAGGGAGGAGCAGCTGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGCTTGACAAGTCCAACCTCCAG  
CAGCCCTATATCACCAACCGCACCTTCATGCTGGCTAAGGAGGCTAGCTTGGCTGATAACAACACAG  
ACGTTTCGTCTCATTGGGGAGAACTGTTCCACGGAGTCAGTATGAGTGAGCGCTGCTATCTGATGA  
AGCAGGTGCTGAACTTCACCCTTGAAGAAGTGCTGTTCCCTCAATCTGATAGGTTCCAGCCTTATAT  
GCAGGAGGTGGTGCCCTTCCTGGCCAGGCTCAGCAACAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGA  
TGACCTGCATATCCAGAGGAATGTGCAAAAGCTGAAGGACACAGTGAAAAAGCTTGGAGAGAGTGG  
AGAGATCAAAGCAATTGGAGAAGTGGATTTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCCTGCATT**TGACC**  
AGAGCAAAGCTGAAAAATGAATAACTAACCCCTTTCCCTGCTAGAAATAACAATTAGATGCCCCA  
AAGCGATTTTTTTTAACCAAAGGAAGATGGGAAGCCAACTCCATCATGATGGGTGGATTCCAAA  
TGAACCCCTGCGTTAGTTACAAAGGAAACCAATGCCACTTTTGTTTATAAGACCAGAAGGTAGACT  
TTCTAAGCATAGATATTTATTGATAACATTTTCATTGTAAGTGGTGTTCTATACACAGAAAACAATT  
TATTTTTTAAATAATTGTCTTTTTTCCATAAAAAAGATTACTTTCCATTCCCTTTAGGGGAAAAAACC  
CCTAAATAGCTTCATGTTTCCATAATCAGTACTTTATATTTATAAATGTATTTATTATTATTATAA  
GACTGCATTTTATTTATATCATTTTATTAATATGGATTTATTTATAGAAACATCATTCGATATTGC  
TACTTGAGTGTAAGGCTAATATTGATATTTATGACAATAATTATAGAGCTATAACATGTTTATTTG  
ACCTCAATAAACACTTGGATATCCC

SEQ ID NO. 70

**FIG. 30**

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGGAAPISSHCRLDKSNFQQPVITNRTFMLAKEASLADN  
NTDVRLIGELFKFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIE  
GDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

SEQIDNO.71

Péptido señal: aminoácidos 1-33

**FIG. 31**

mIL22mIgG2a

Proteína

MAVLQKSMSFSLMGTLAASCLLLIALWAQEANALPVNTRCKLEVSNFQOPYIVNRTFMLA  
KEASLADNNTDVRLIGEKLFGRVSAKDQCYLMKQVLNFTLEDVLLPQSDRFQPYMQEVVP  
FLTCLSNQLSSCHISGDDQNIQKNVRRKLVKKGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACVAR  
GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWNVN  
NVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK  
GSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMYTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD  
SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSYVHEGLHNHHTTKSFSTRTPGK

SEQ. ID. NO. 73

**FIG. 32A**

mIL22mIgG2a

secuencia de ADN:

ATGGCTGTCCTGCAGAAATCTATGAGTTTTTCCCTTATGGGGACTTTGGCCGCCAGCTG  
CCTGCTTCTCATTTGCCCTGTGGGCCCAGGAGGCAAAATGCGC  
TGCCCGTCAACACCCGGTGCAAGCTTGAGGTGTCCAATTCCAGCAGCCATACATCGT  
CAACCGCACCTTTATGCTGGCCAAGGAGGCCAGCCTTGCAGA  
TAACAACACAGATGTCCGGCTCATCGGGGAGAACTGTTCCGAGGAGTCAGTGCTAAG  
GATCAGTGCTACCTGATGAAGCAGGTGCTCAACTTCACCCTG  
GAAGACGTTCTGCTCCCCAGTCAGACAGGTTCAGCCCTACATGCAGGAGGTGGTGC  
CTTTCCTGACCAAACTCAGCAATCAGCTCAGCTCCTGTCACA  
TCAGCGGTGACGACCAGAACATCCAGAAGAATGTCAGAAGGCTGAAGGAGACAGTGA  
AAAAGCTTGAGAGAGTGGAGAGATCAAGGCGATTGGGGAACT  
GGACCTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCTTGCGTCGCTCGAGGACCCACAATCAAG  
CCCTGTCTCCATGCAAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGT  
GGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAG  
CCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATG  
ACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGAC  
ACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTACGCGTGGT  
CAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAG  
GTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCATCGAGAGAACCATC  
TCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCCTCCACCAGAAG  
AAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACCTCTGACCTGCATGGTCA  
CAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGC  
TAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCTTGGACTCTGATGGTTC  
TTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAG  
CTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCAC  
ACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGA

SEQ. ID. NO. 72

**FIG. 32B**

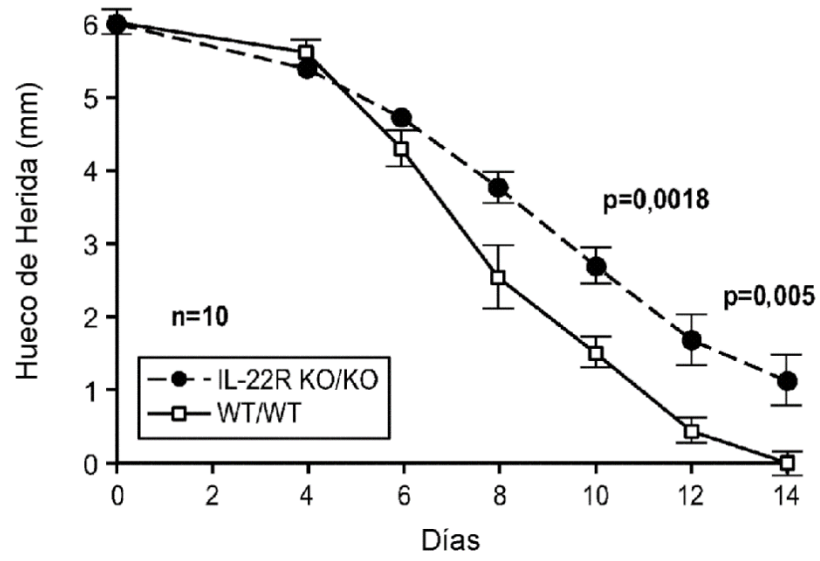


**FIG. 33**

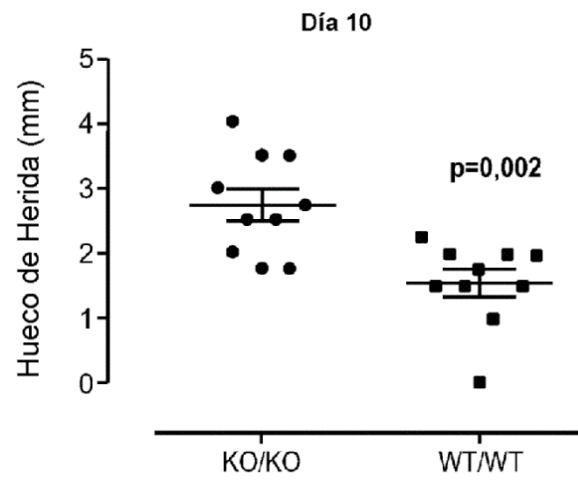


**FIG. 34A**

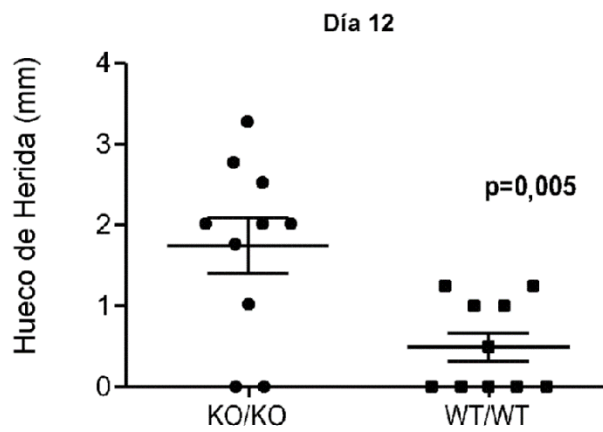


**FIG. 34B**

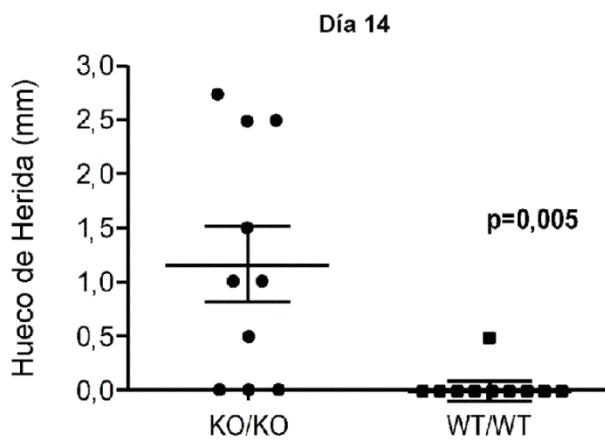


**FIG. 34C**

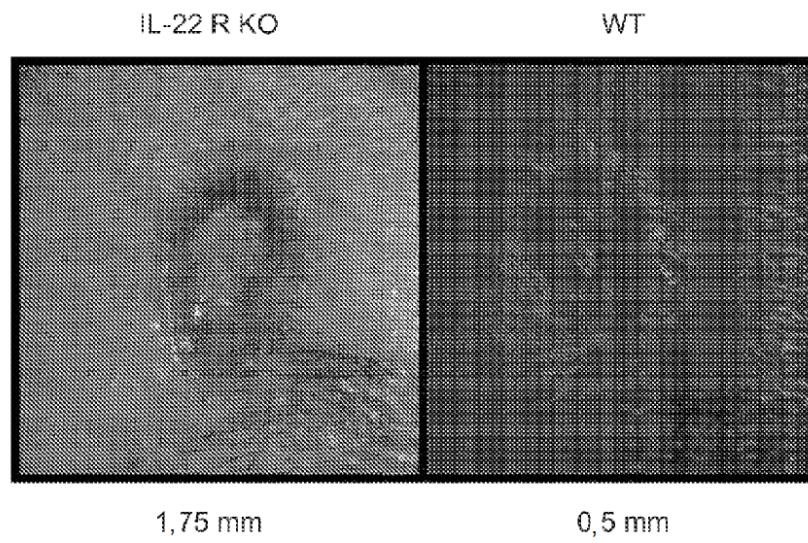


**FIG. 34D**

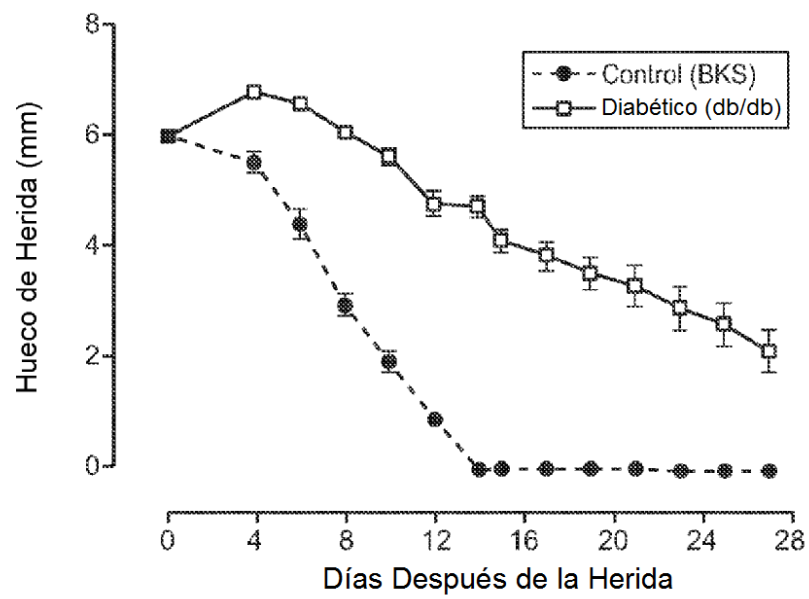


**FIG. 35A**

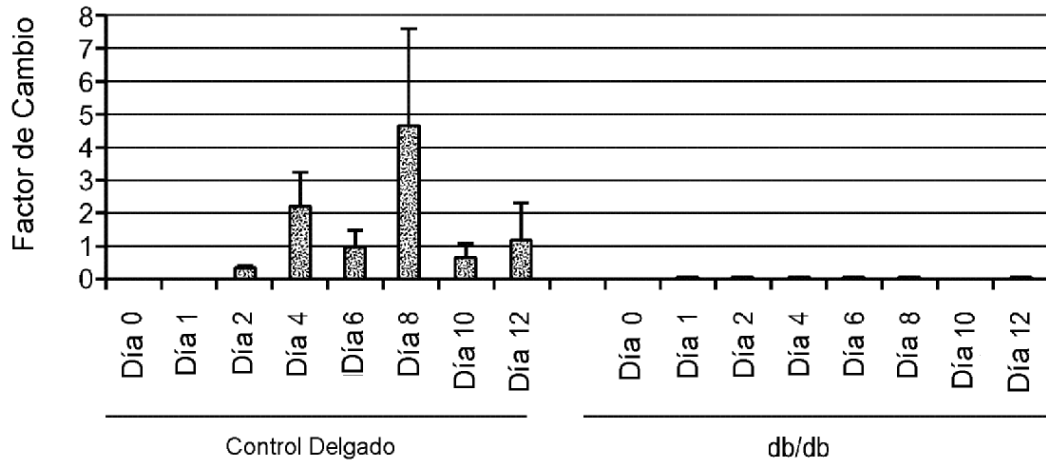


**FIG. 35B**

Diseño Experimental

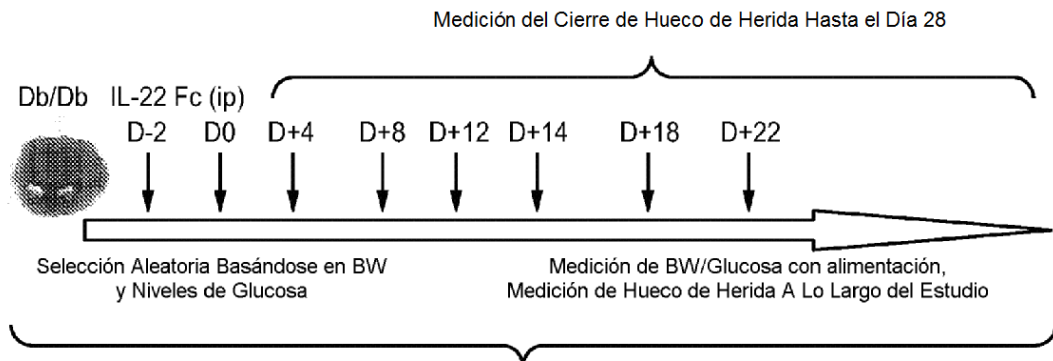


**FIG. 36**

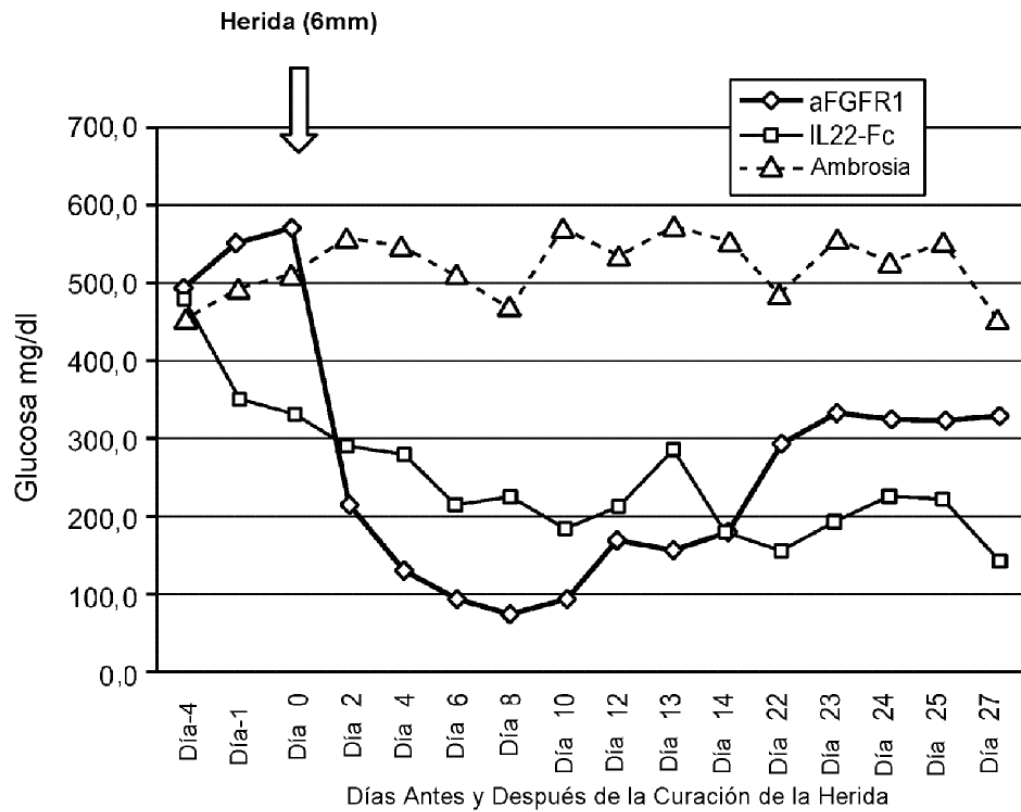


**FIG. 37**

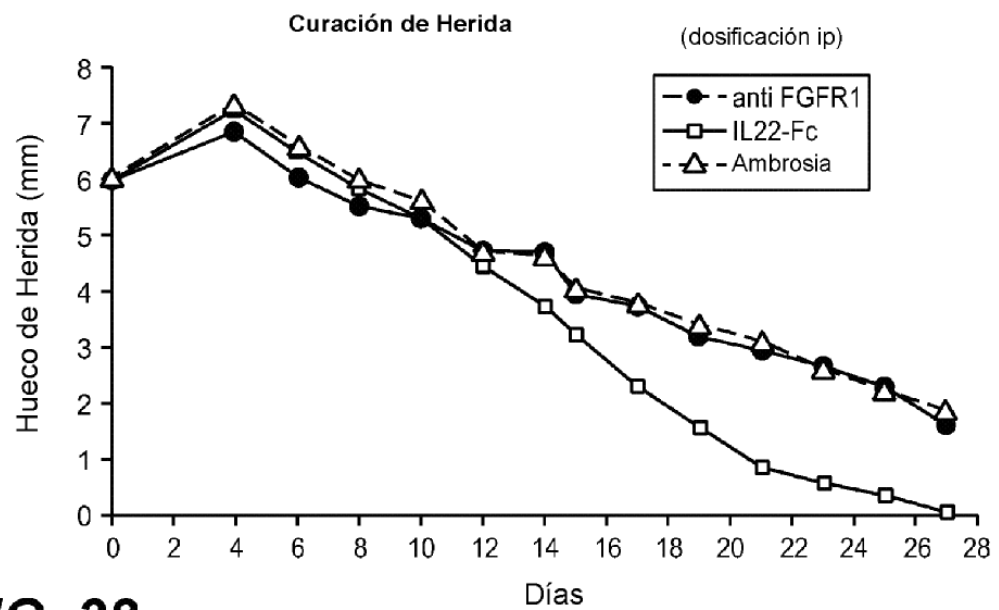
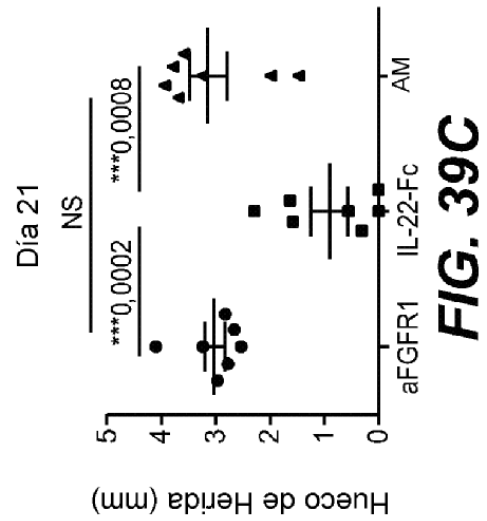
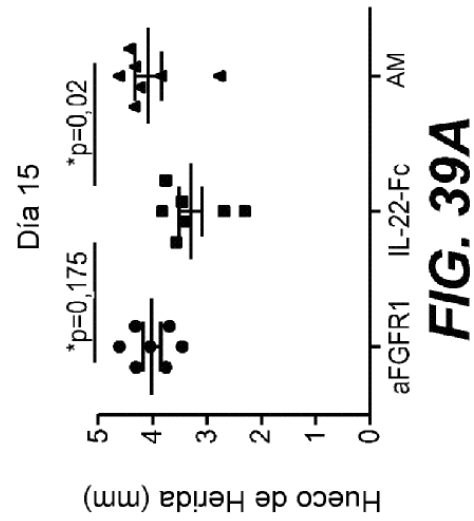
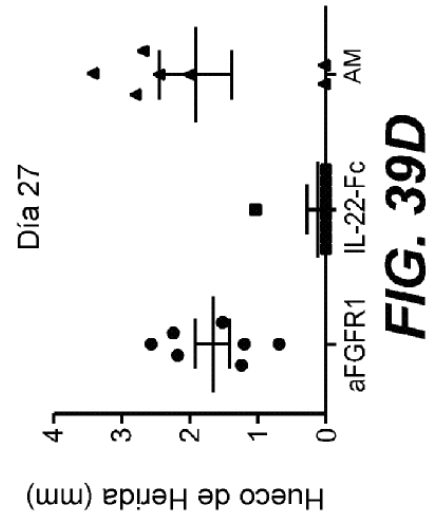
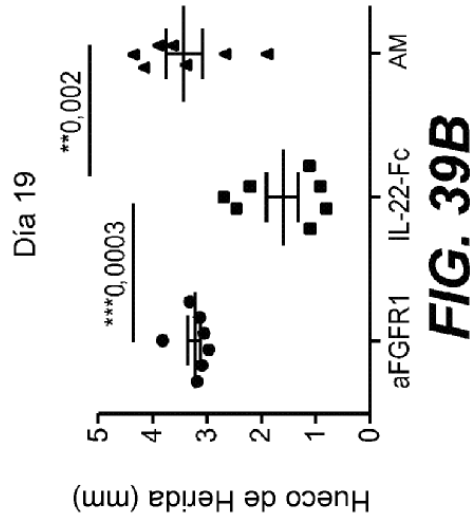
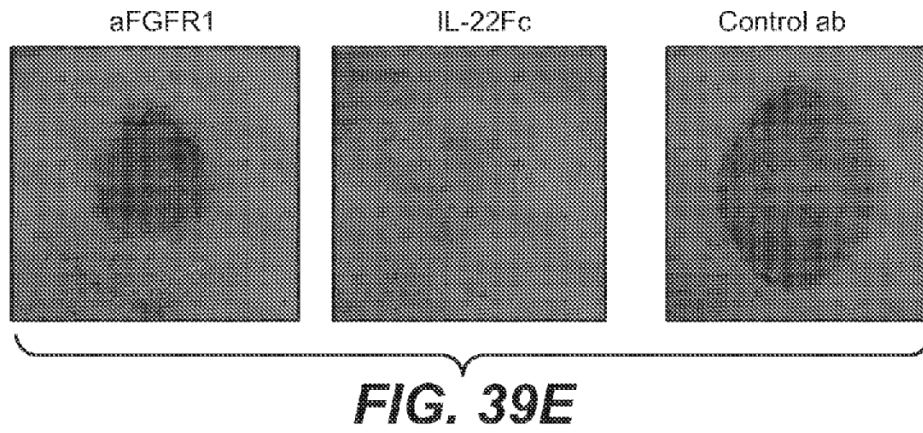
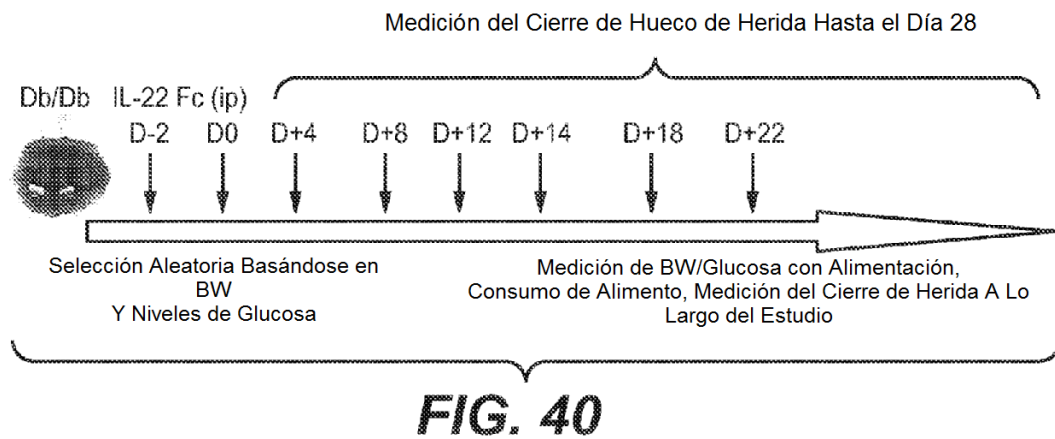


**FIG. 38**





Diseño Experimental



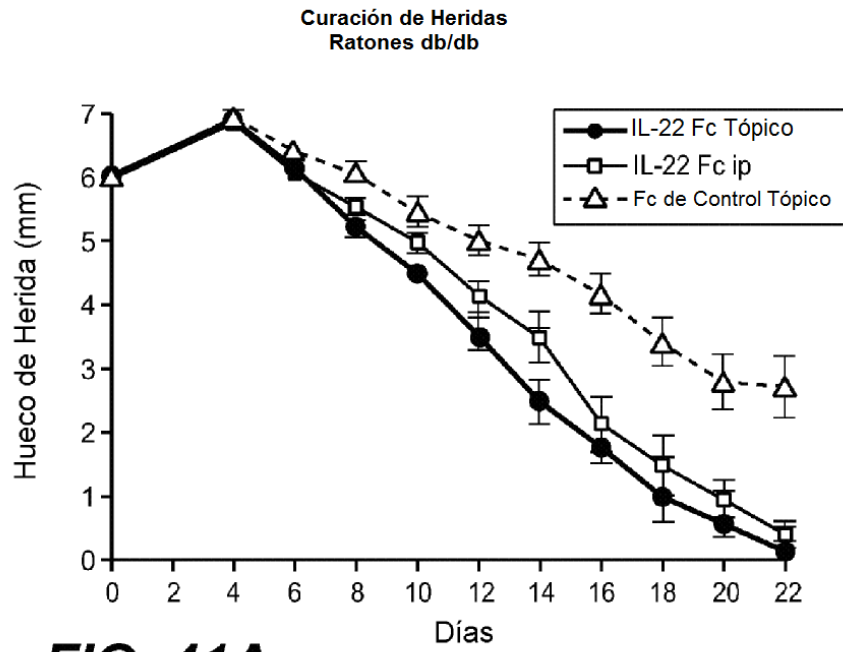


**FIG. 41A**

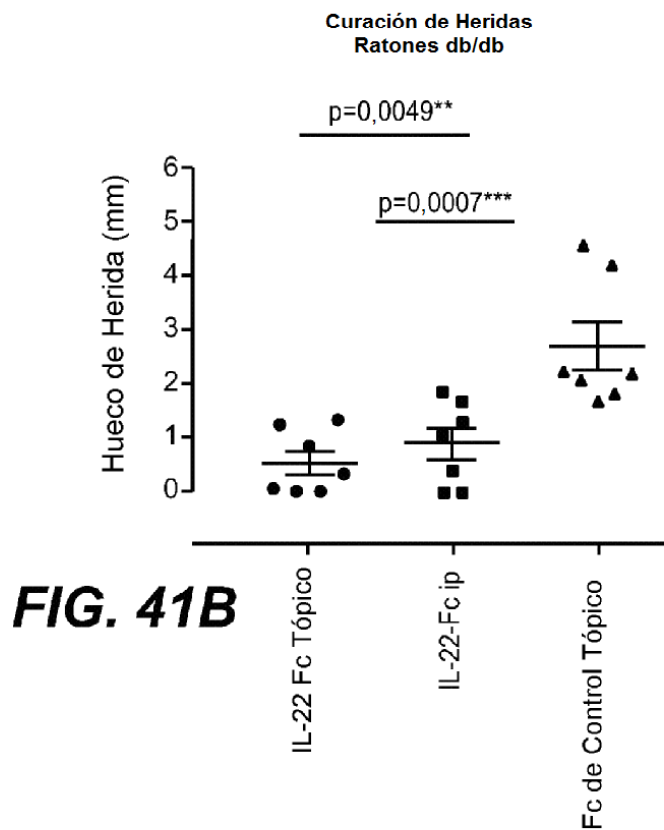


**FIG. 41B**

**Anticuerpo de  
Control:**

Vista SUPERIOR

Vista Posterior

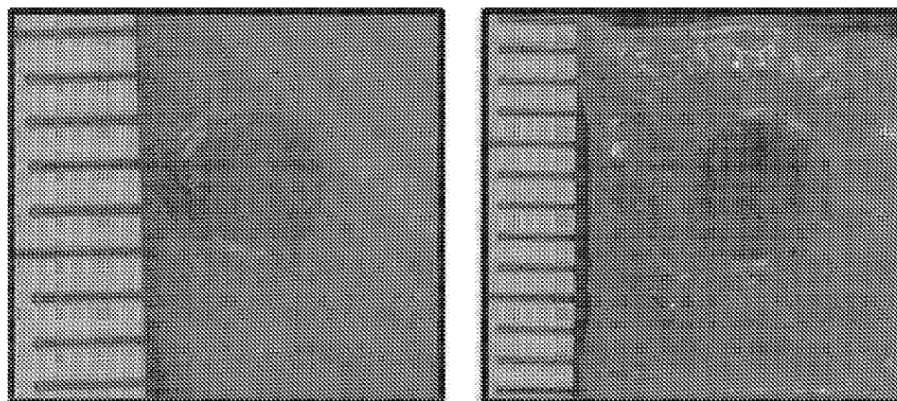


**FIG. 42A**

**IL-22Fc:**

Vista SUPERIOR

Vista Posterior

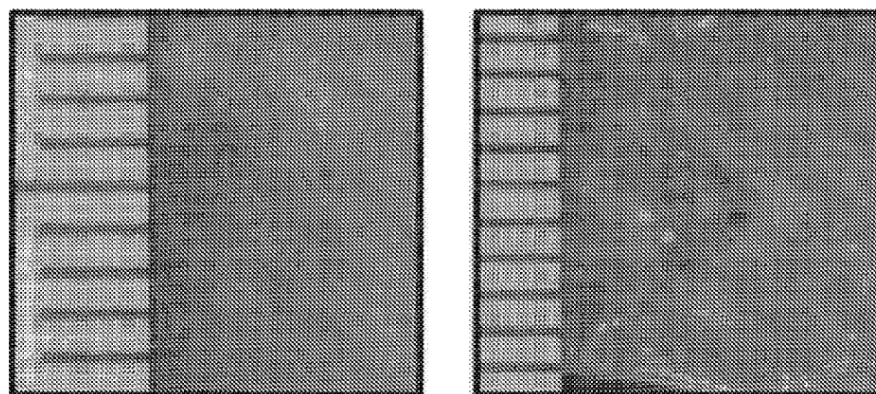


**FIG. 42B**

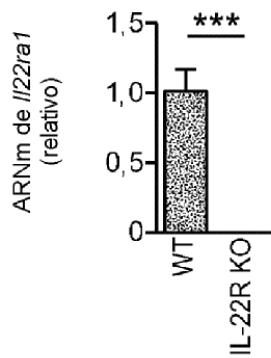
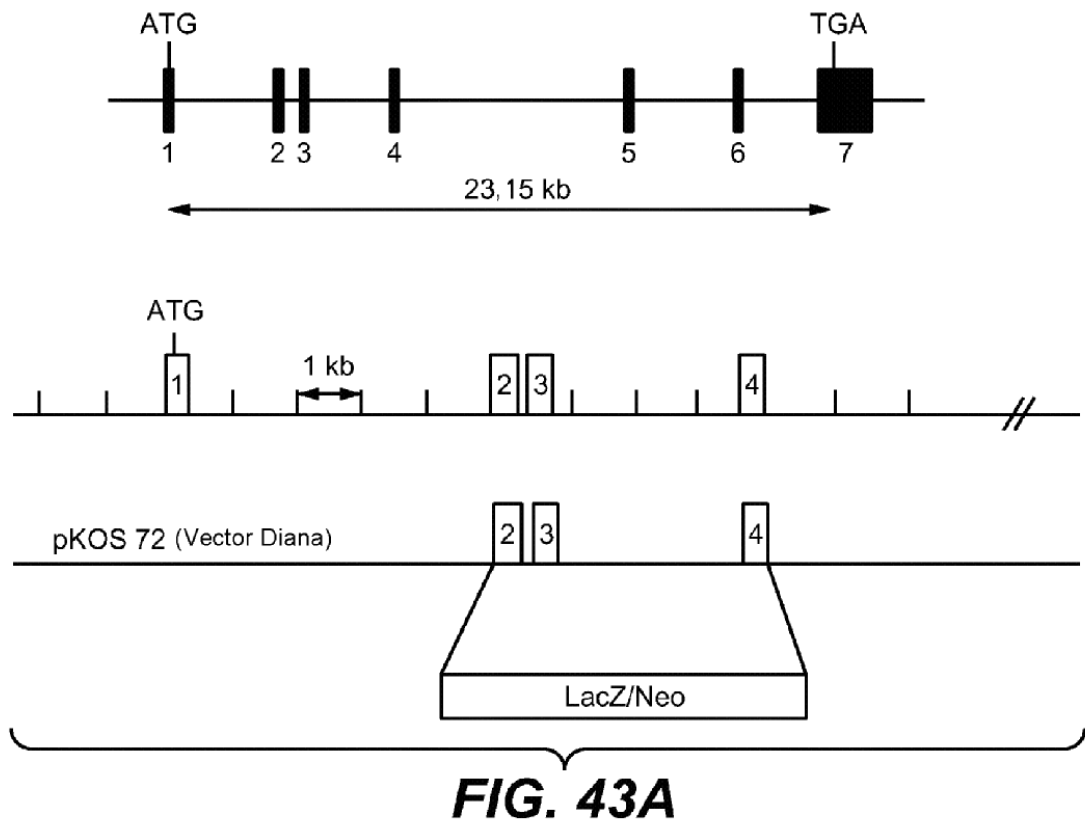


**FIG. 43B**

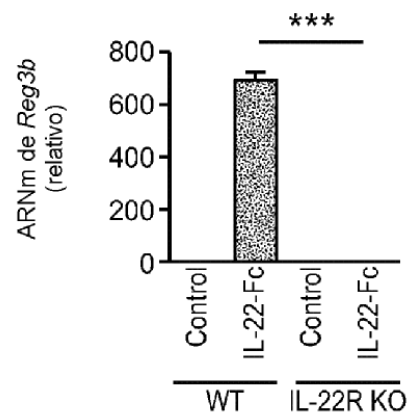


**FIG. 43C**

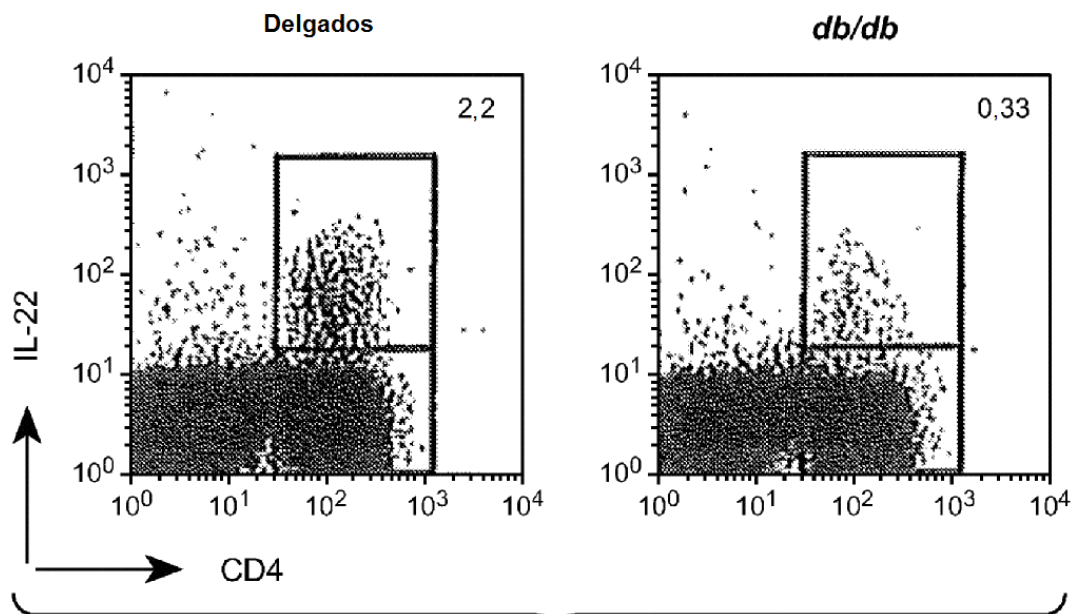


**FIG. 44A**

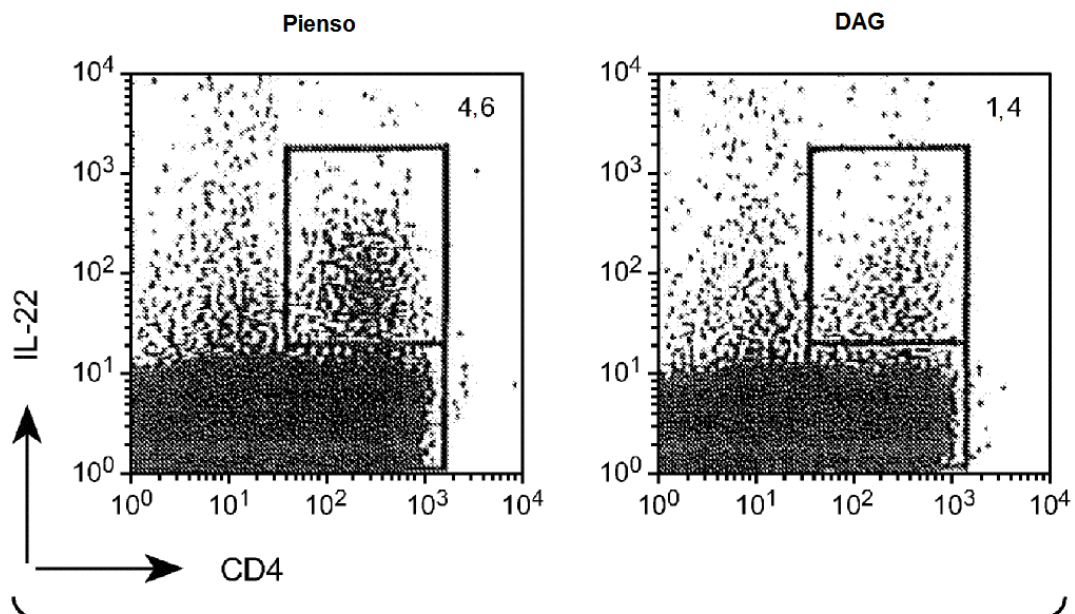


**FIG. 44C**

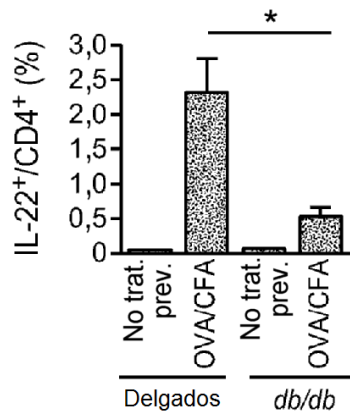


**FIG. 44B**

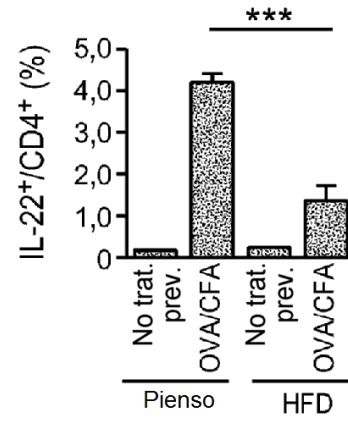


**FIG. 44D**

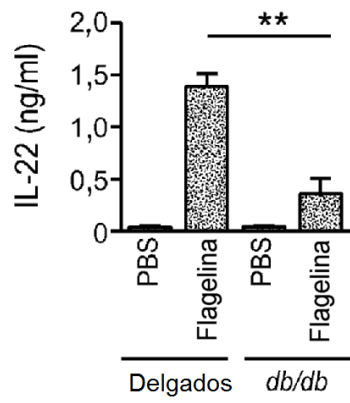


**FIG. 44E**

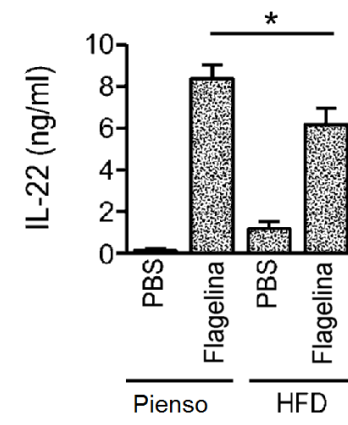
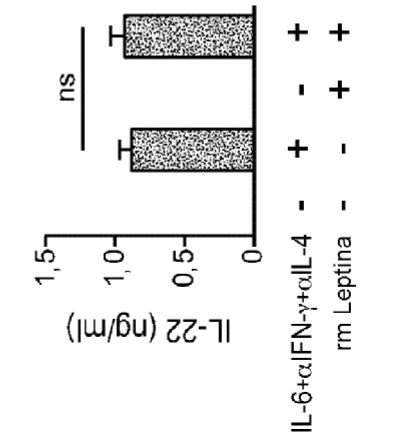
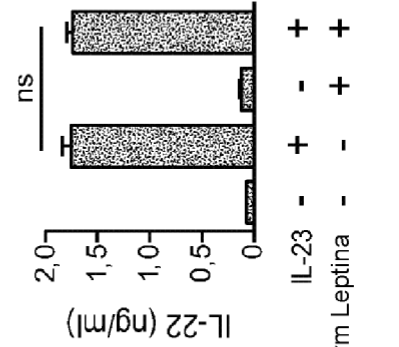
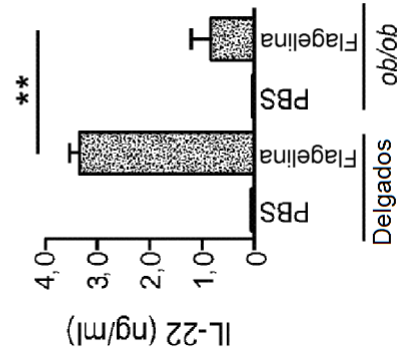
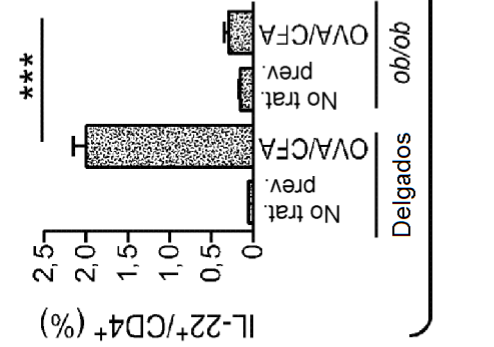
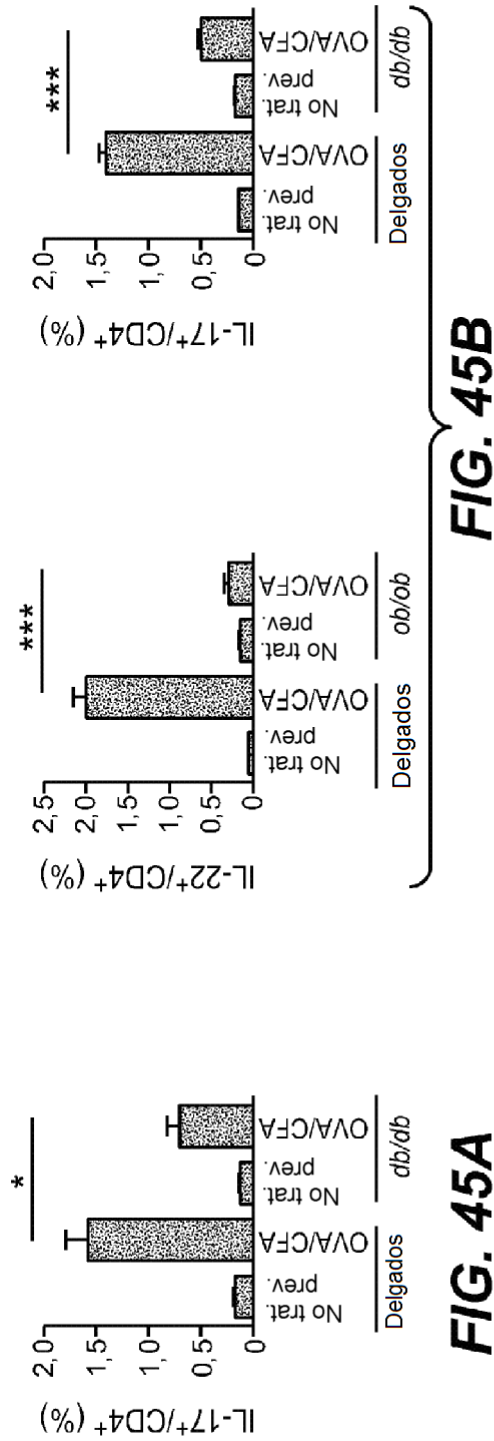


**FIG. 44F**



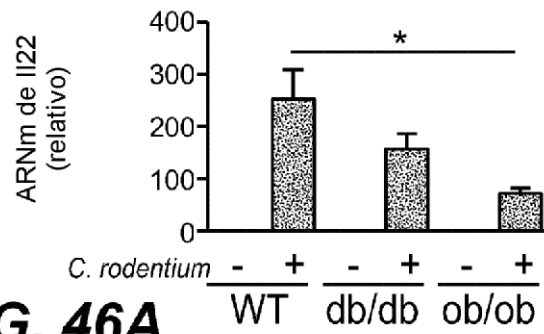


**FIG. 46A**

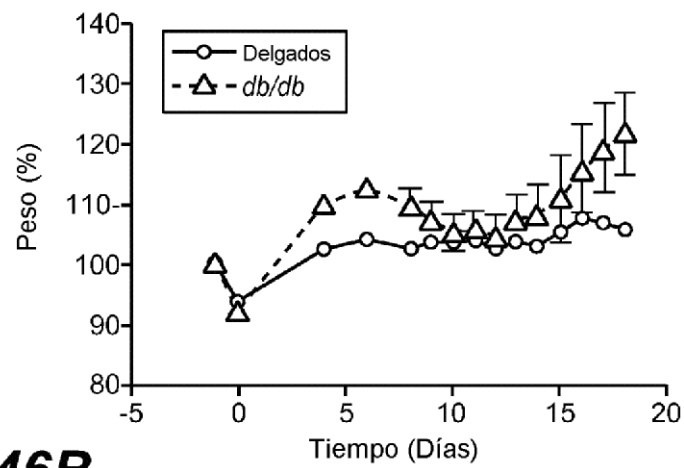


**FIG. 46B**

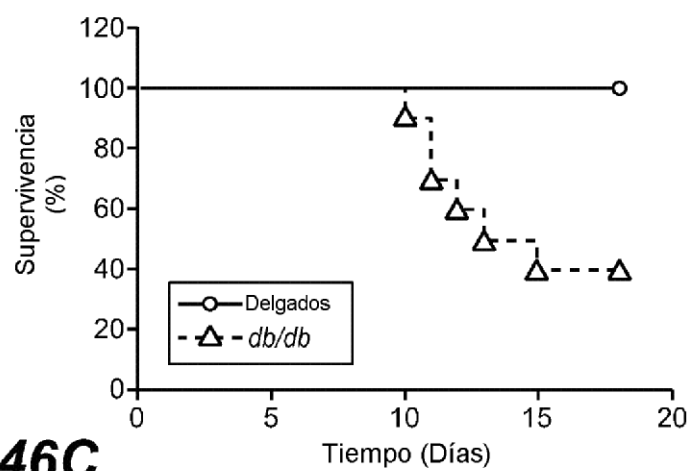


**FIG. 46C**

Delgados

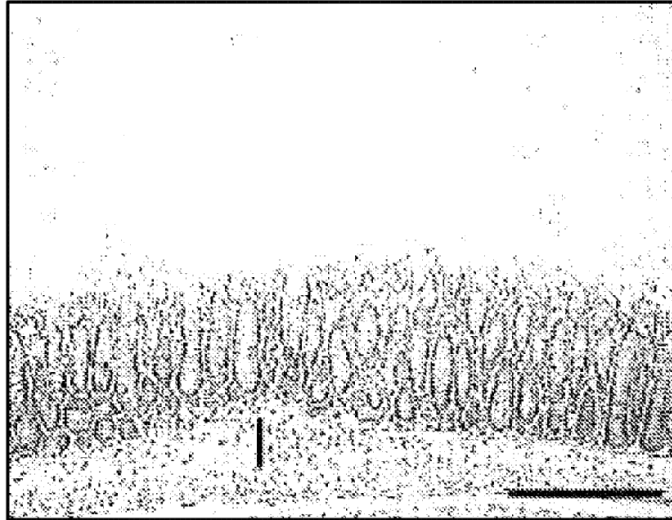


**FIG. 46D**

*db/db*

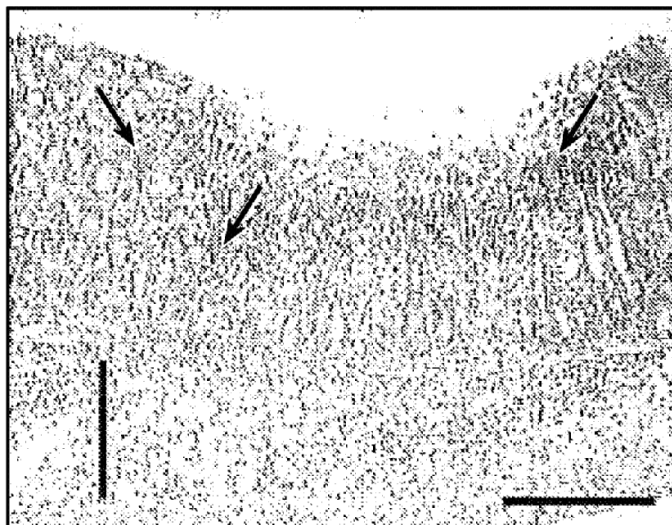


**FIG. 46E**

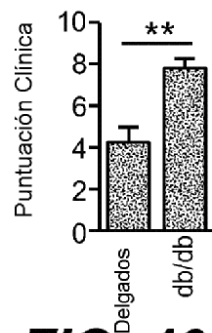


**FIG. 46F**

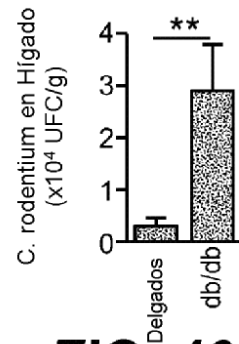


**FIG. 46G**

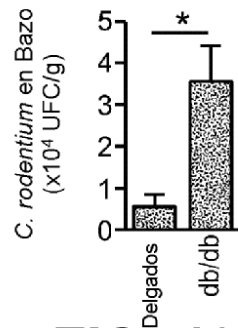


**FIG. 46H**

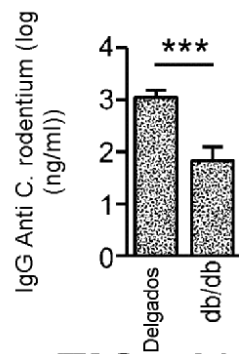


**FIG. 46I**

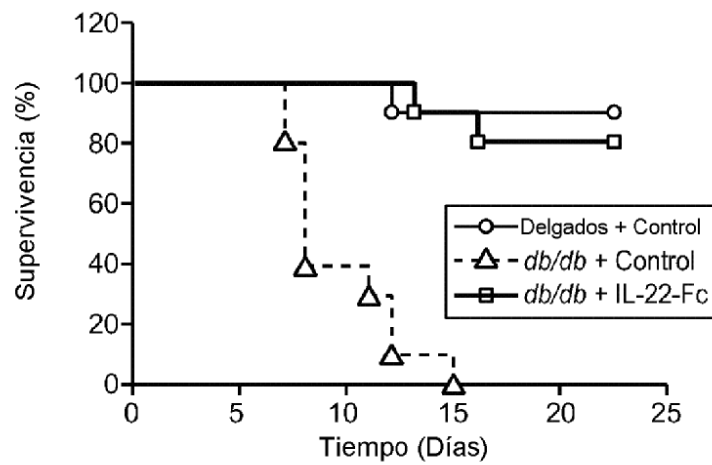


**FIG. 46J**

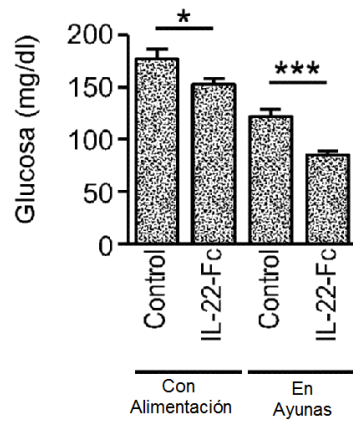


**FIG. 47A**

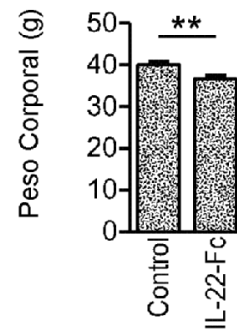


**FIG. 47B**

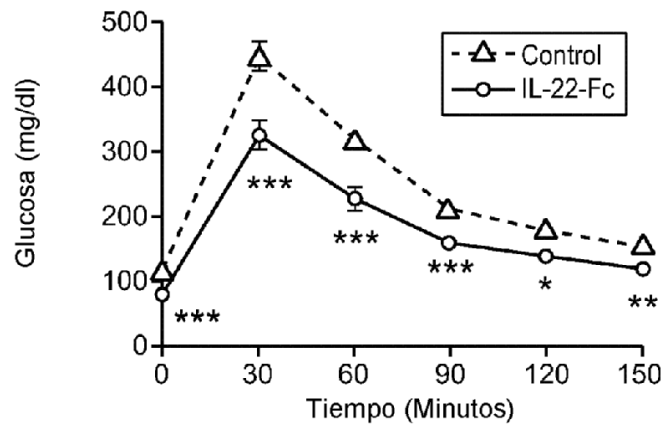
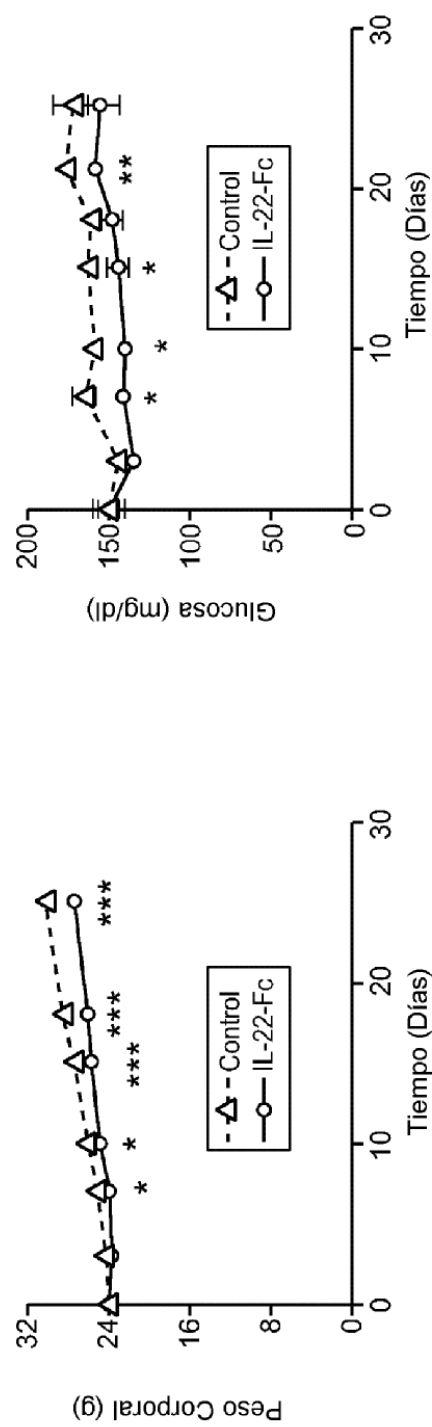
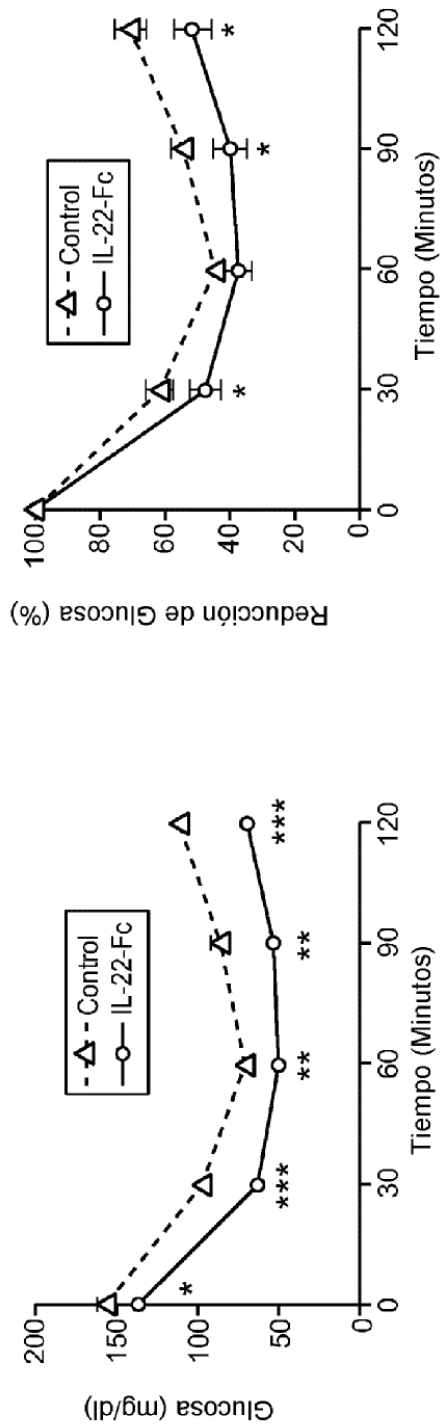


**FIG. 47C**



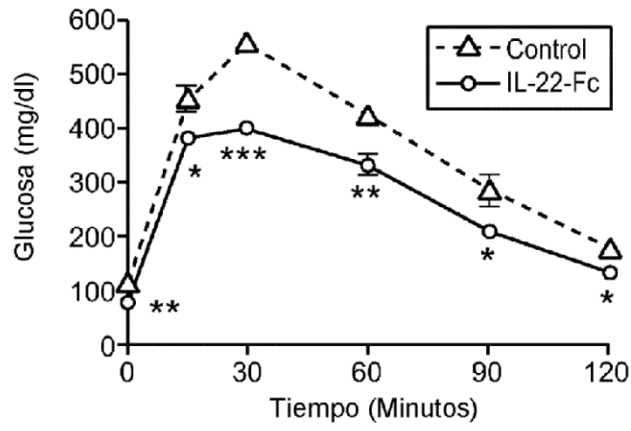


**FIG. 48C**

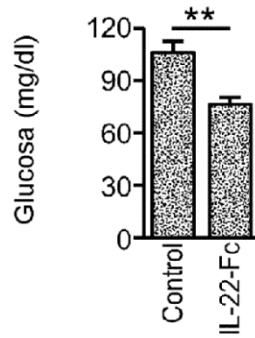


**FIG. 48D**

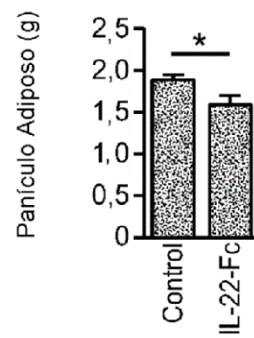


**FIG. 48E**

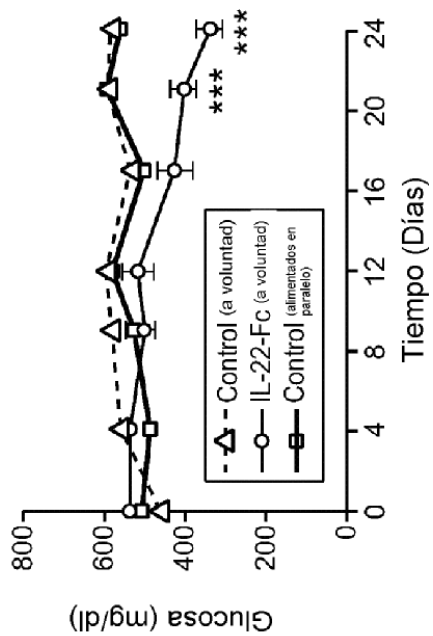


FIG. 49B

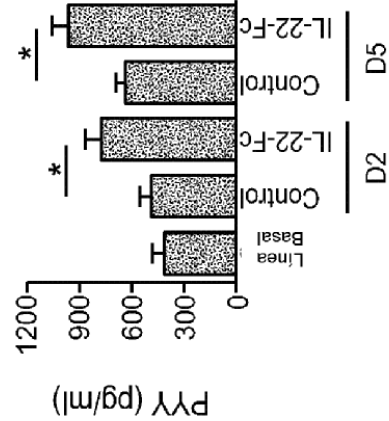


FIG. 49D

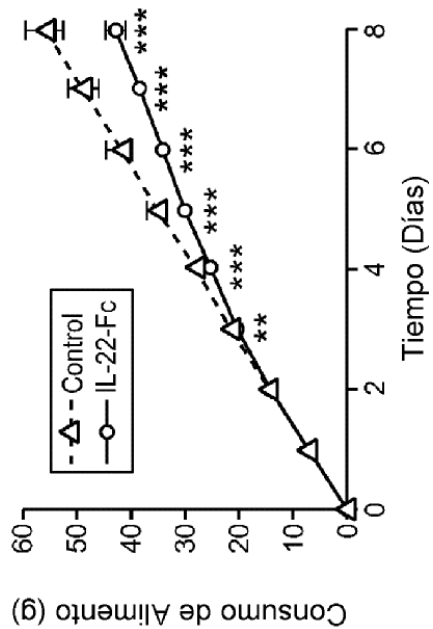


FIG. 49A

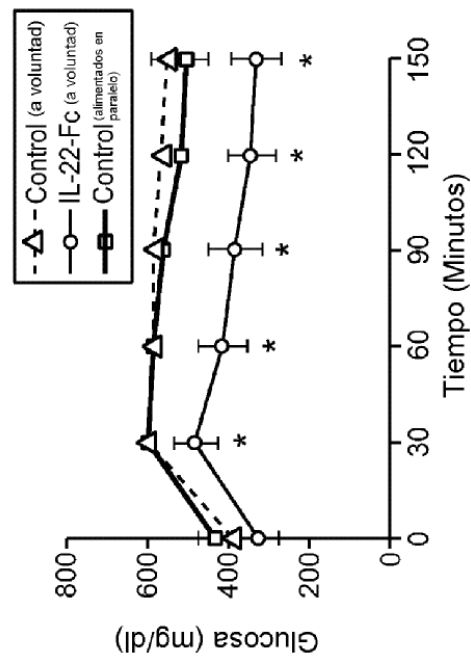


FIG. 49C

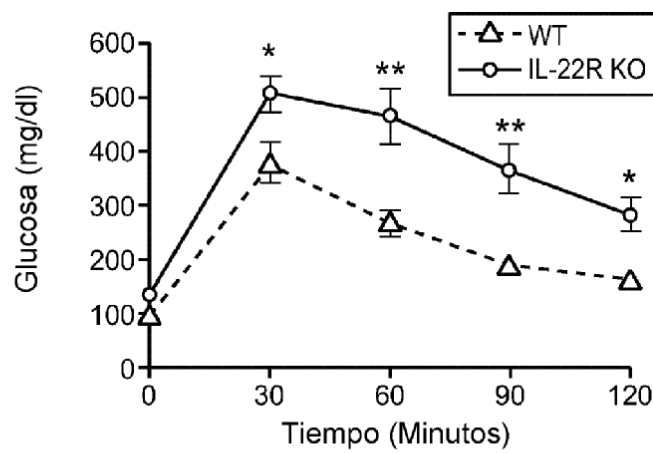
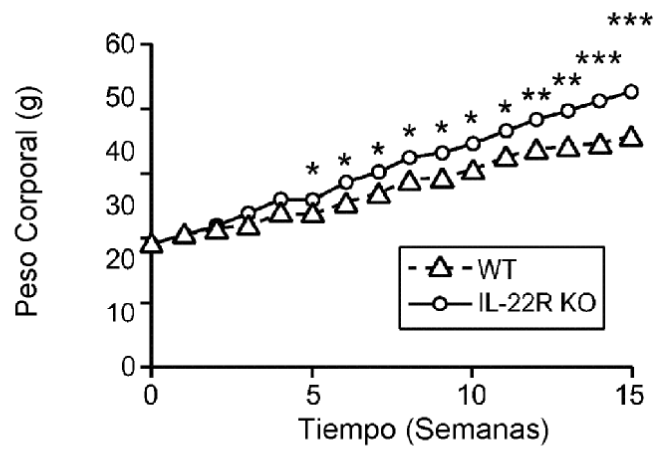
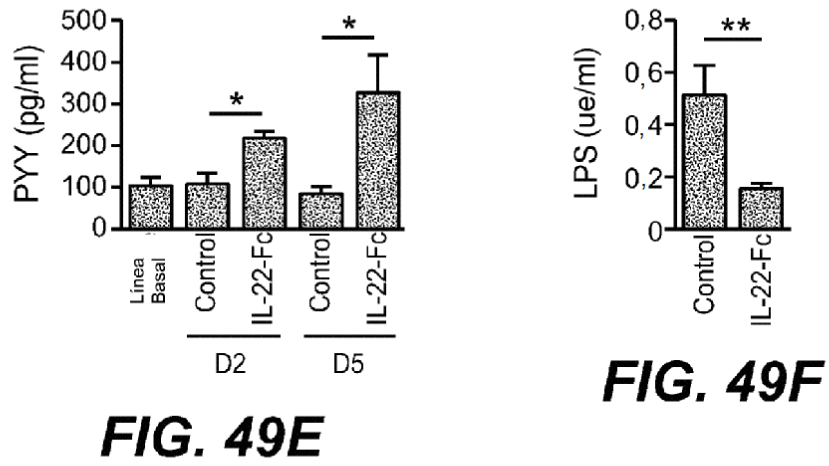


**FIG. 49I**

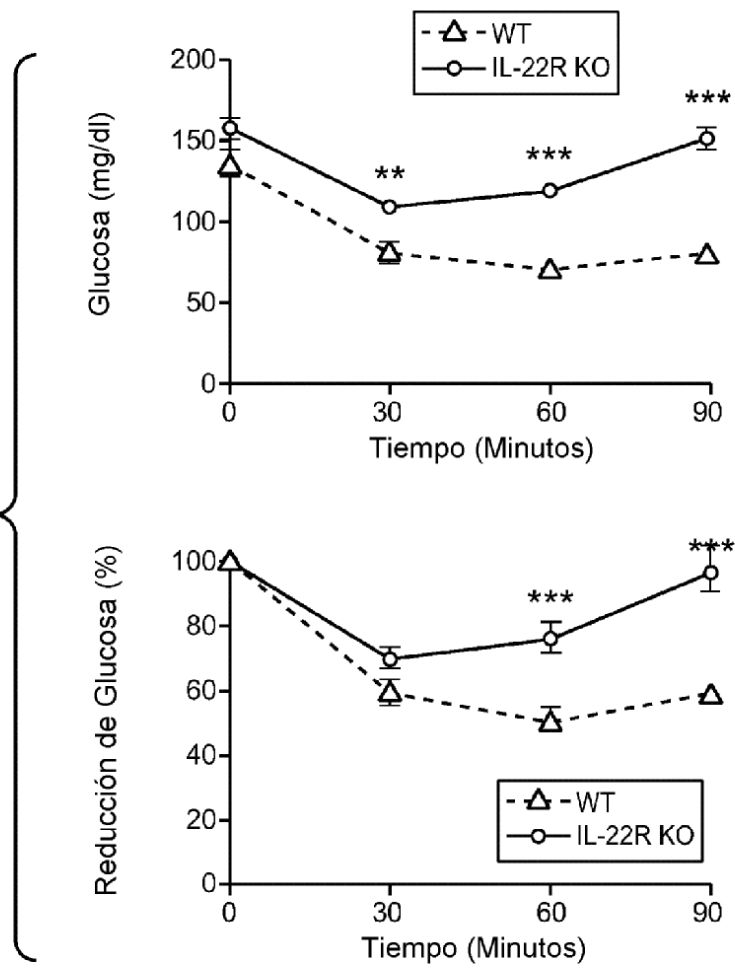
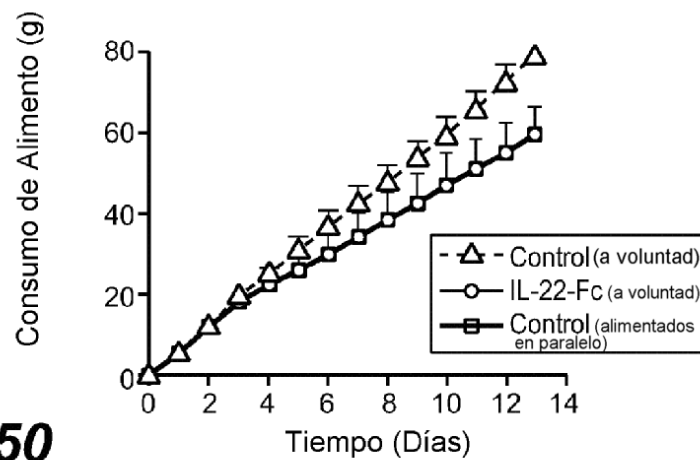


**FIG. 50**



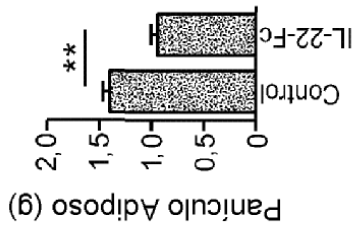


**FIG. 51C**

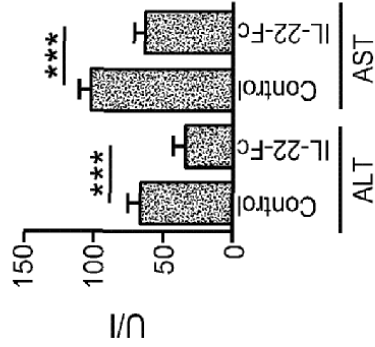


**FIG. 51B**

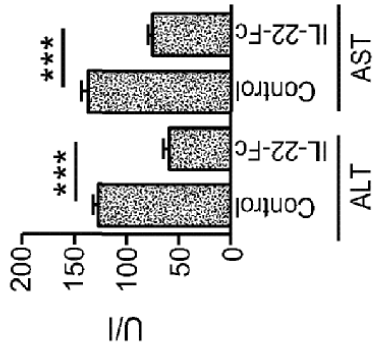


**FIG. 51A**

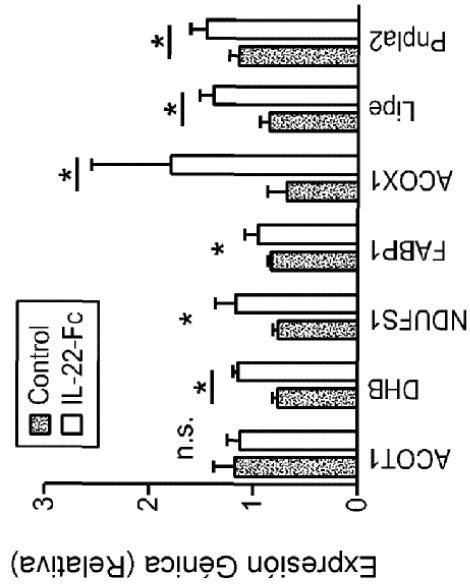


**FIG. 51D**

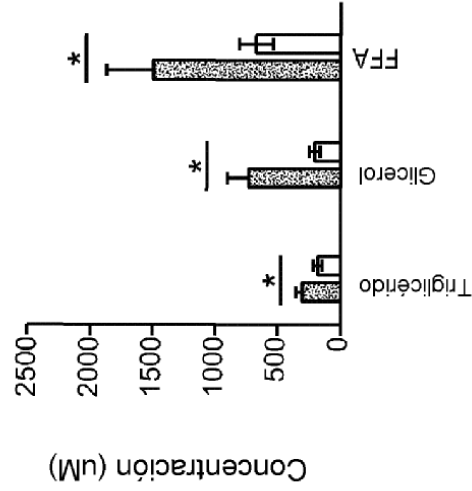


**FIG. 51E**

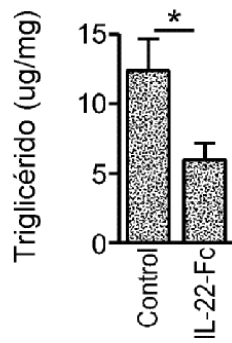


**FIG. 51F**

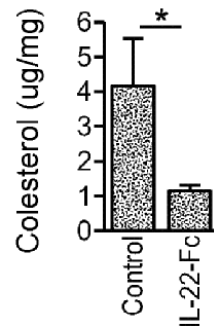


**FIG. 51G**

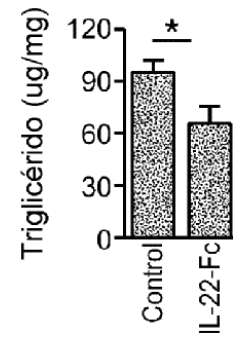


**FIG. 51H**

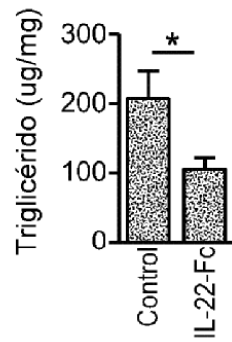


**FIG. 51I**

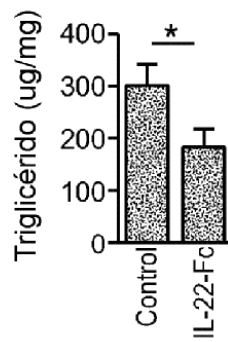


**FIG. 51J**

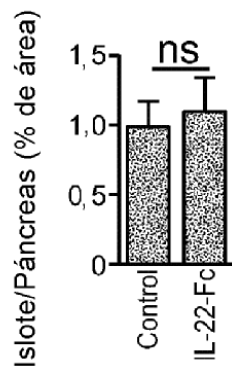


**FIG. 52A**

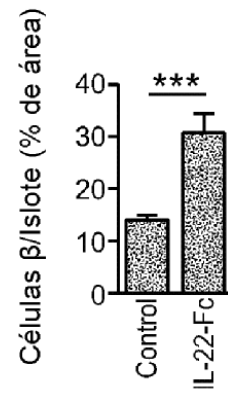


**FIG. 52B**

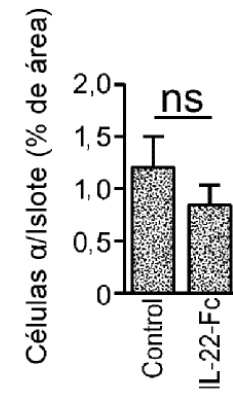


**FIG. 52C**

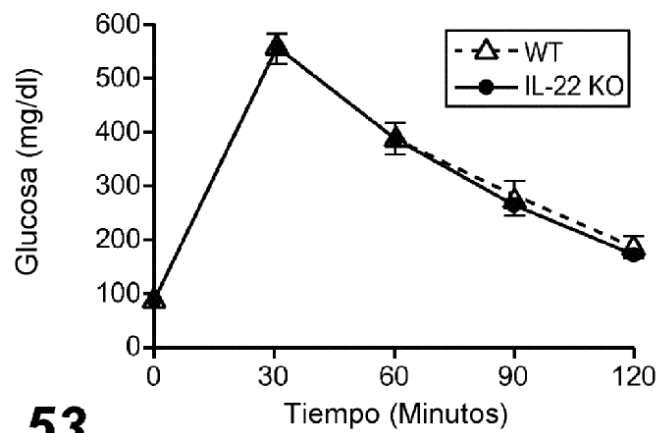


**FIG. 53**

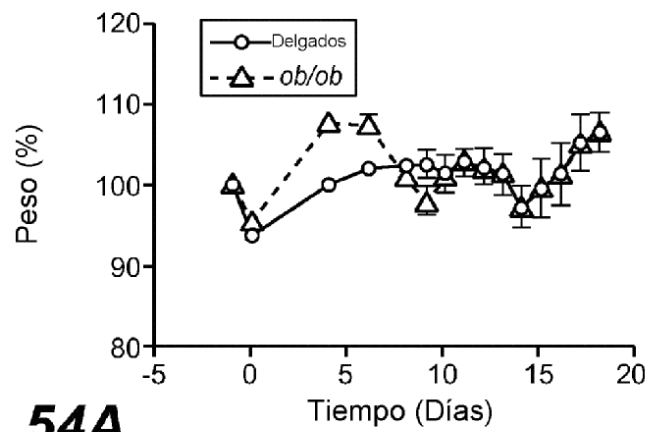


**FIG. 54A**

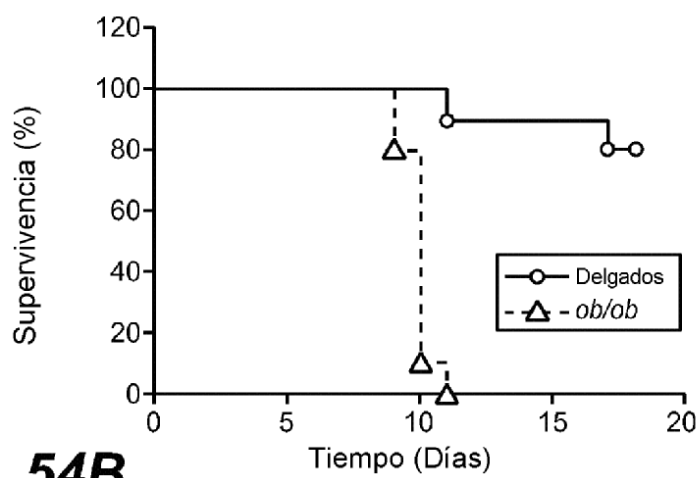


**FIG. 54B**

Delgados

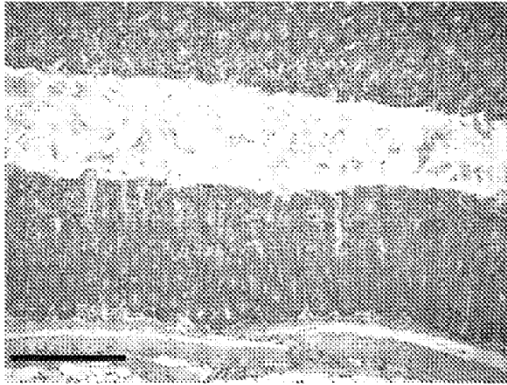


**FIG. 54C**

ob/ob

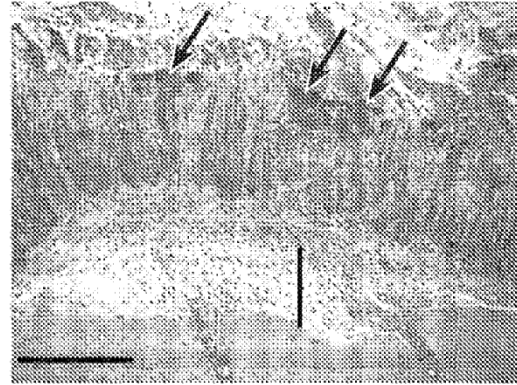


**FIG. 54D**

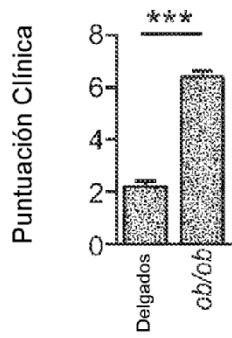


**FIG. 54E**

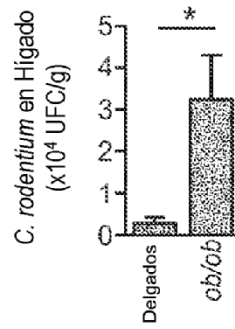


**FIG. 54F**

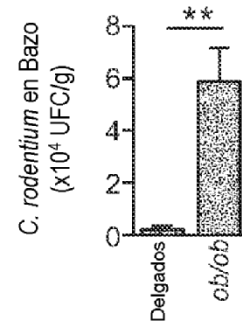


**FIG. 54G**

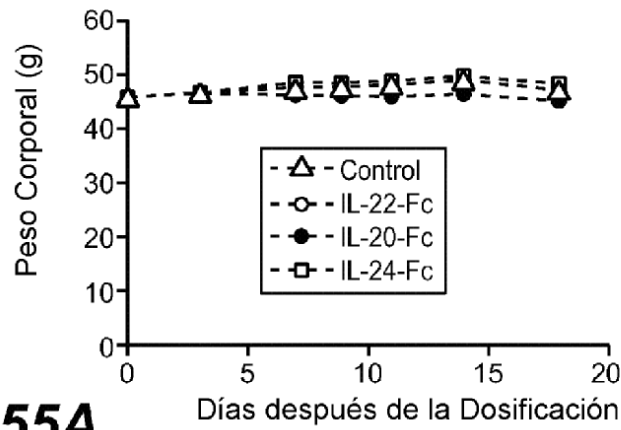


**FIG. 55A**

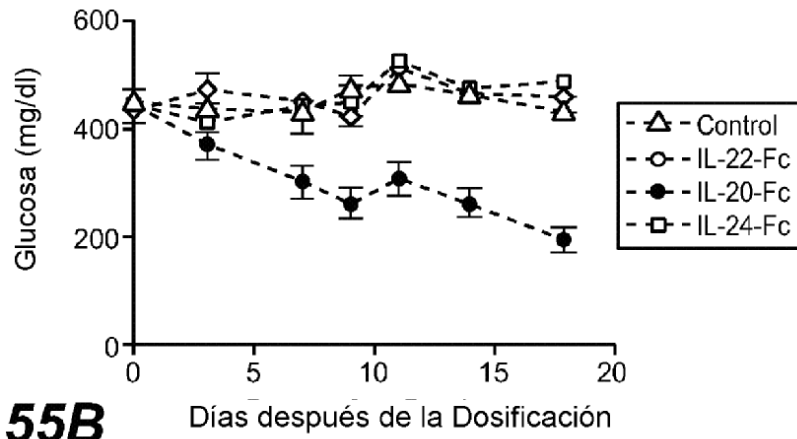


**FIG. 55B**

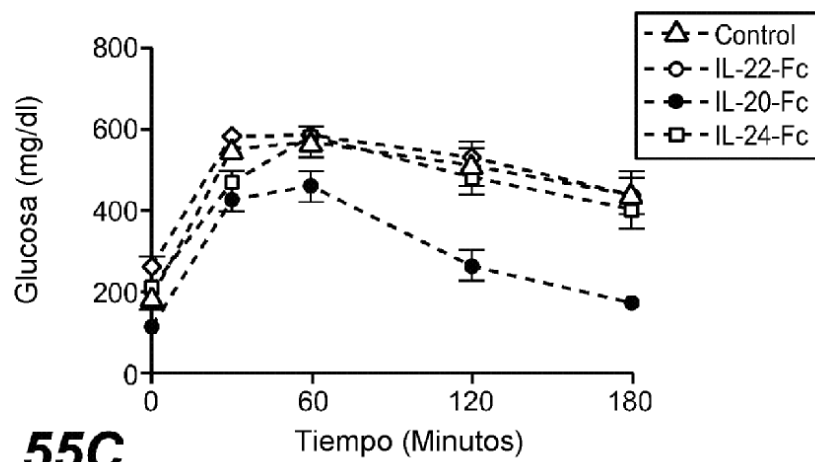


**FIG. 55C**

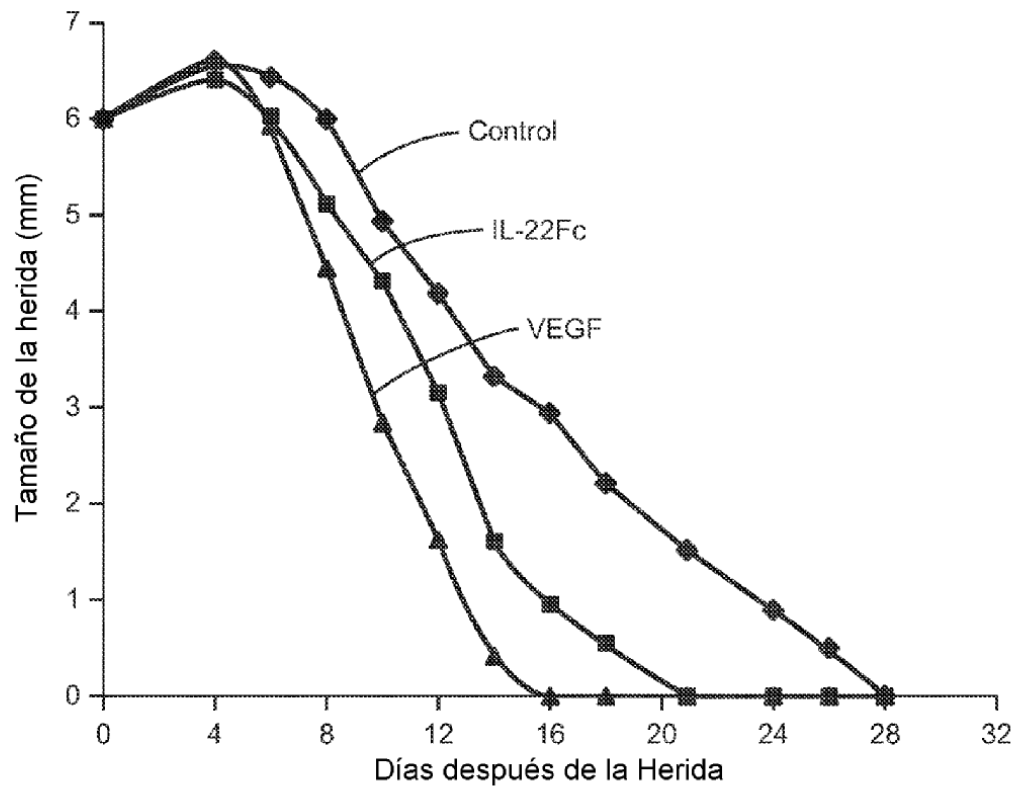


**FIG. 56A**

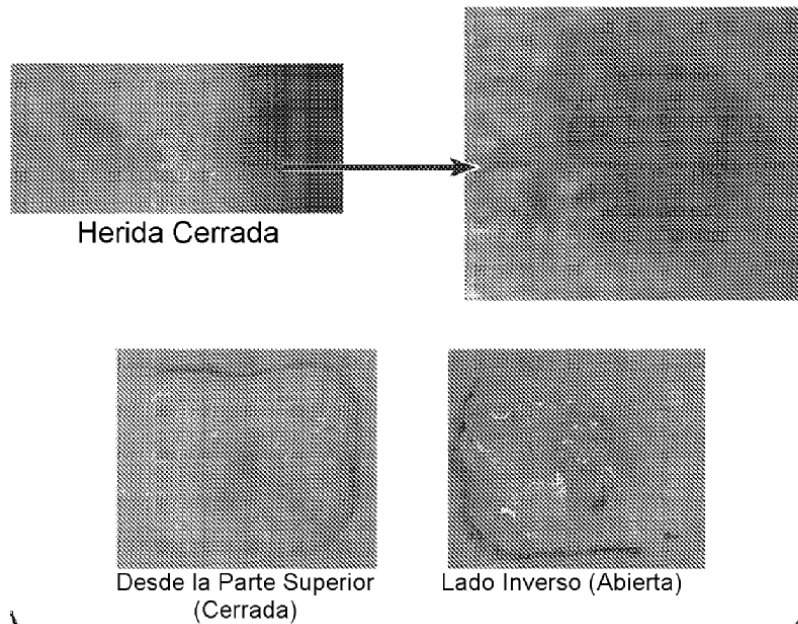
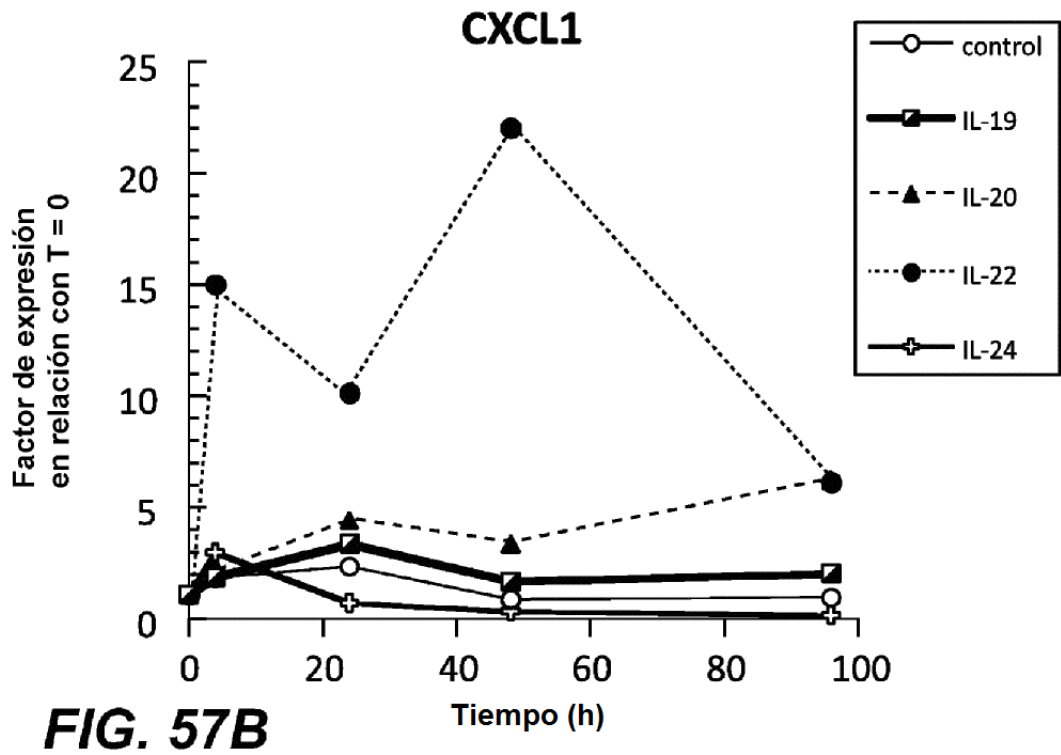
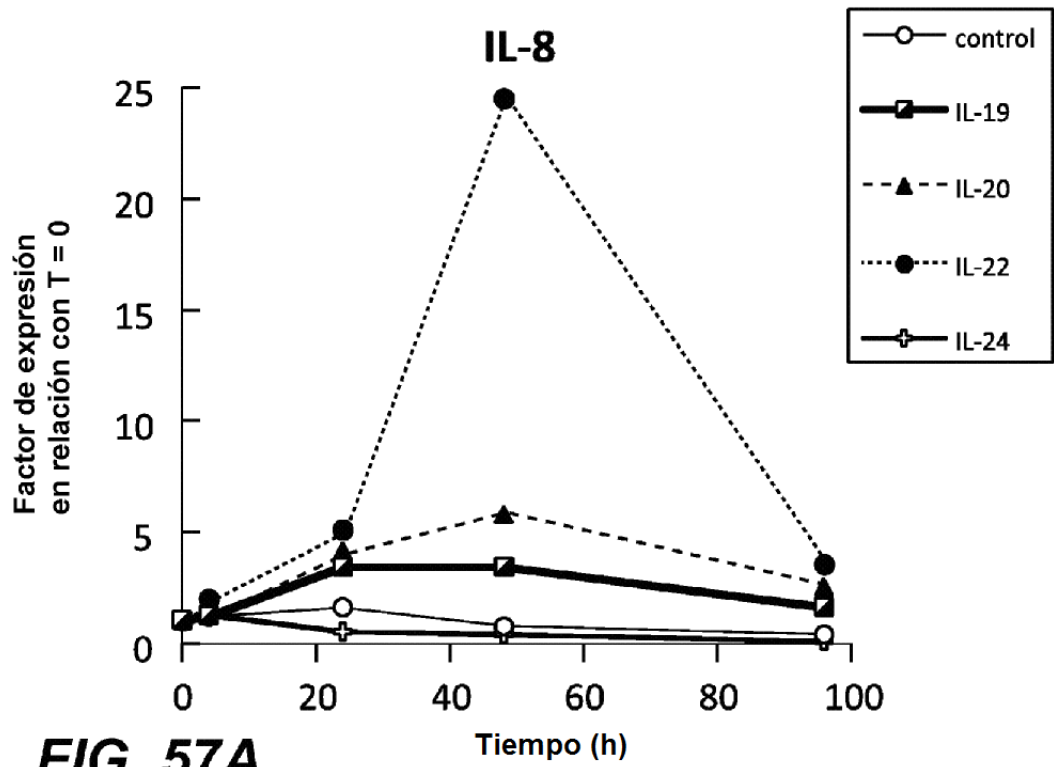
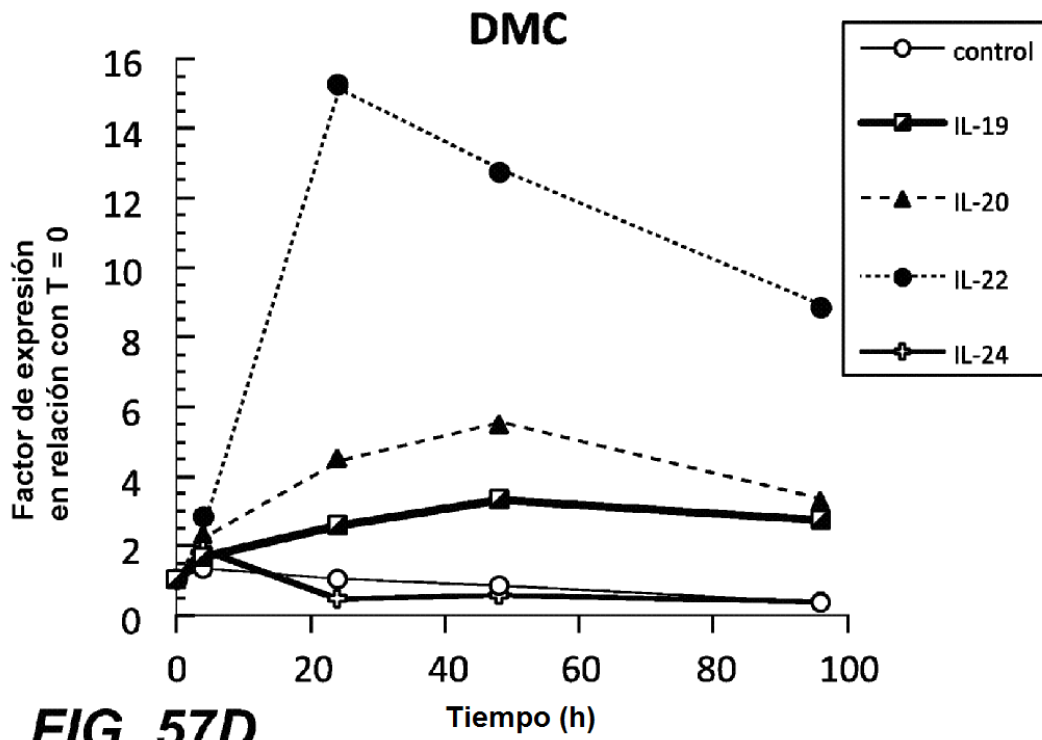
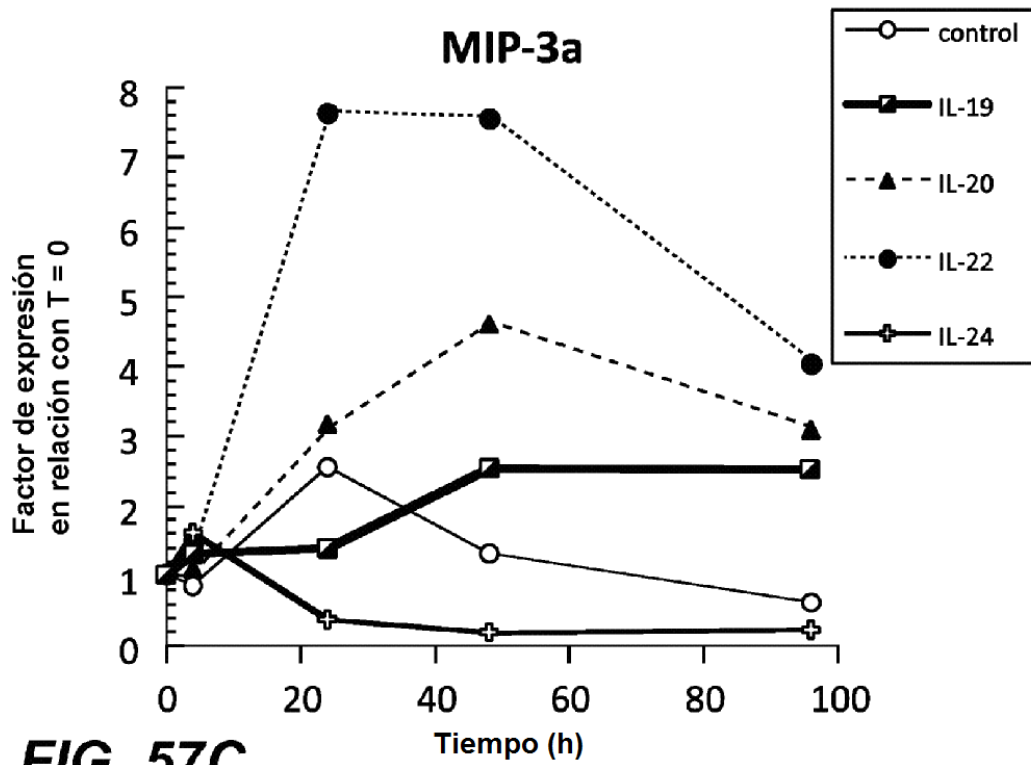
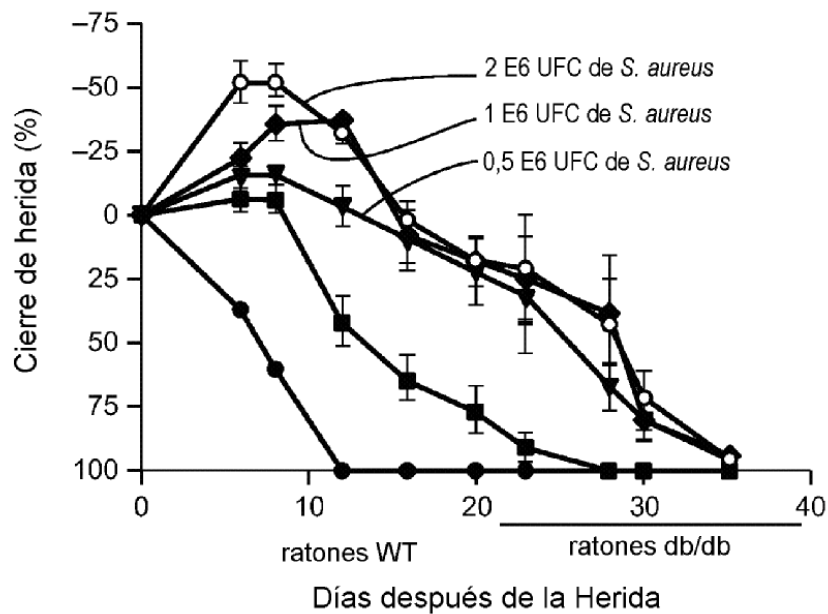
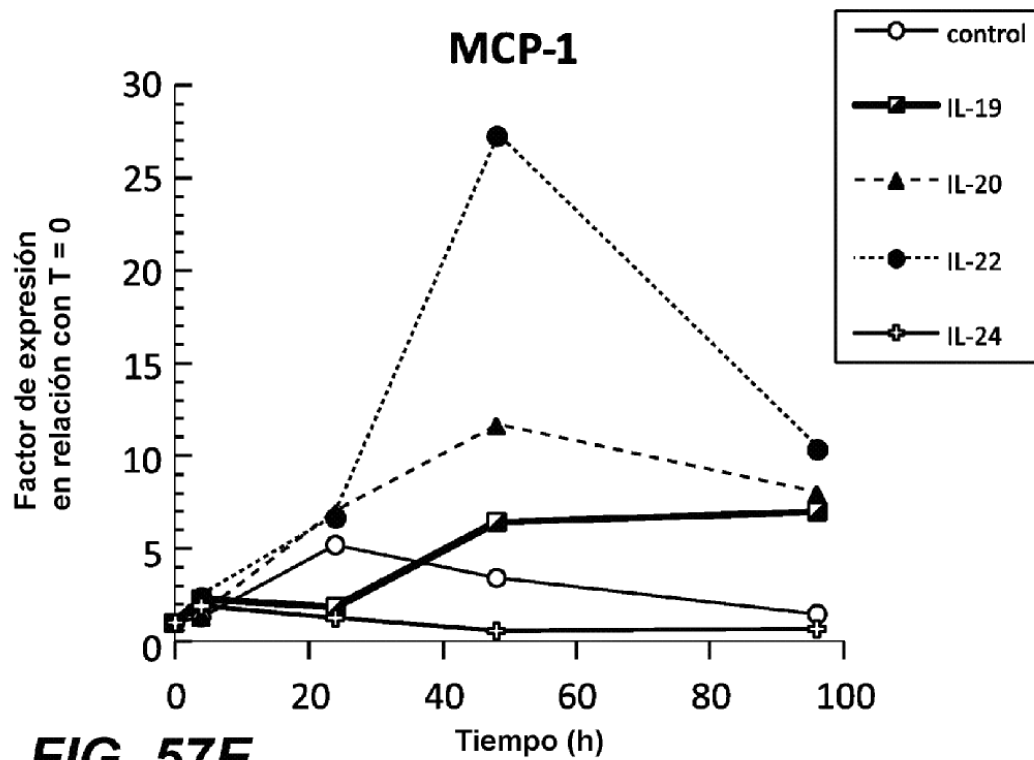


**FIG. 56B**







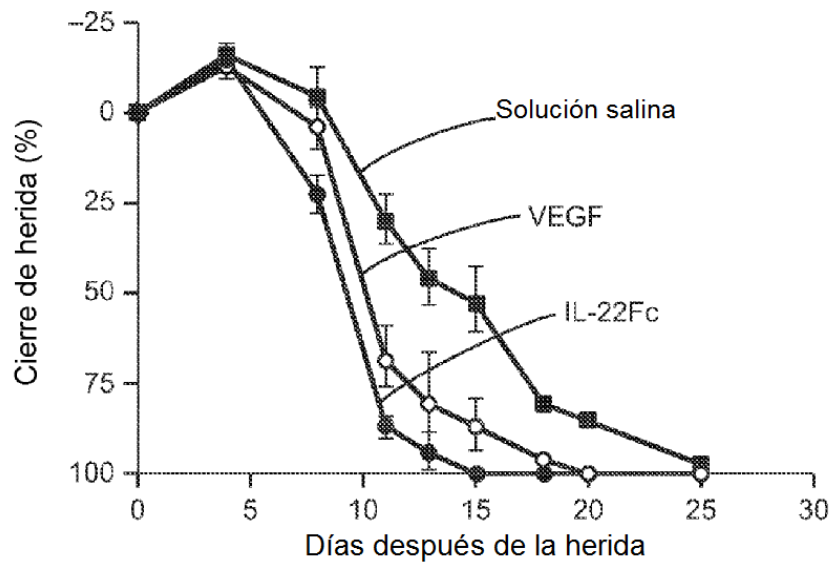


**FIG. 59A**

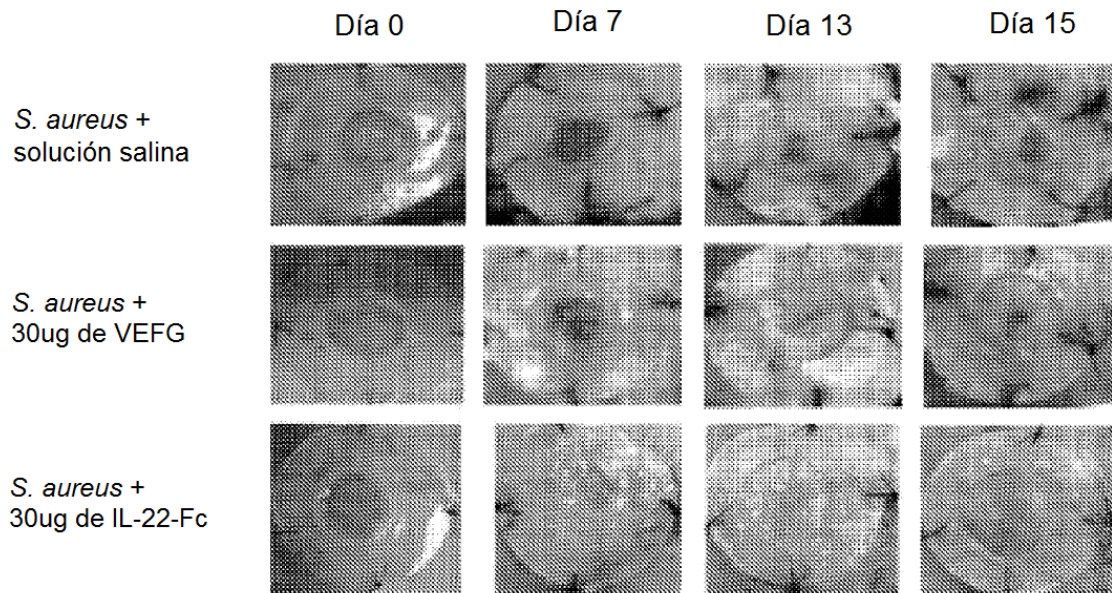
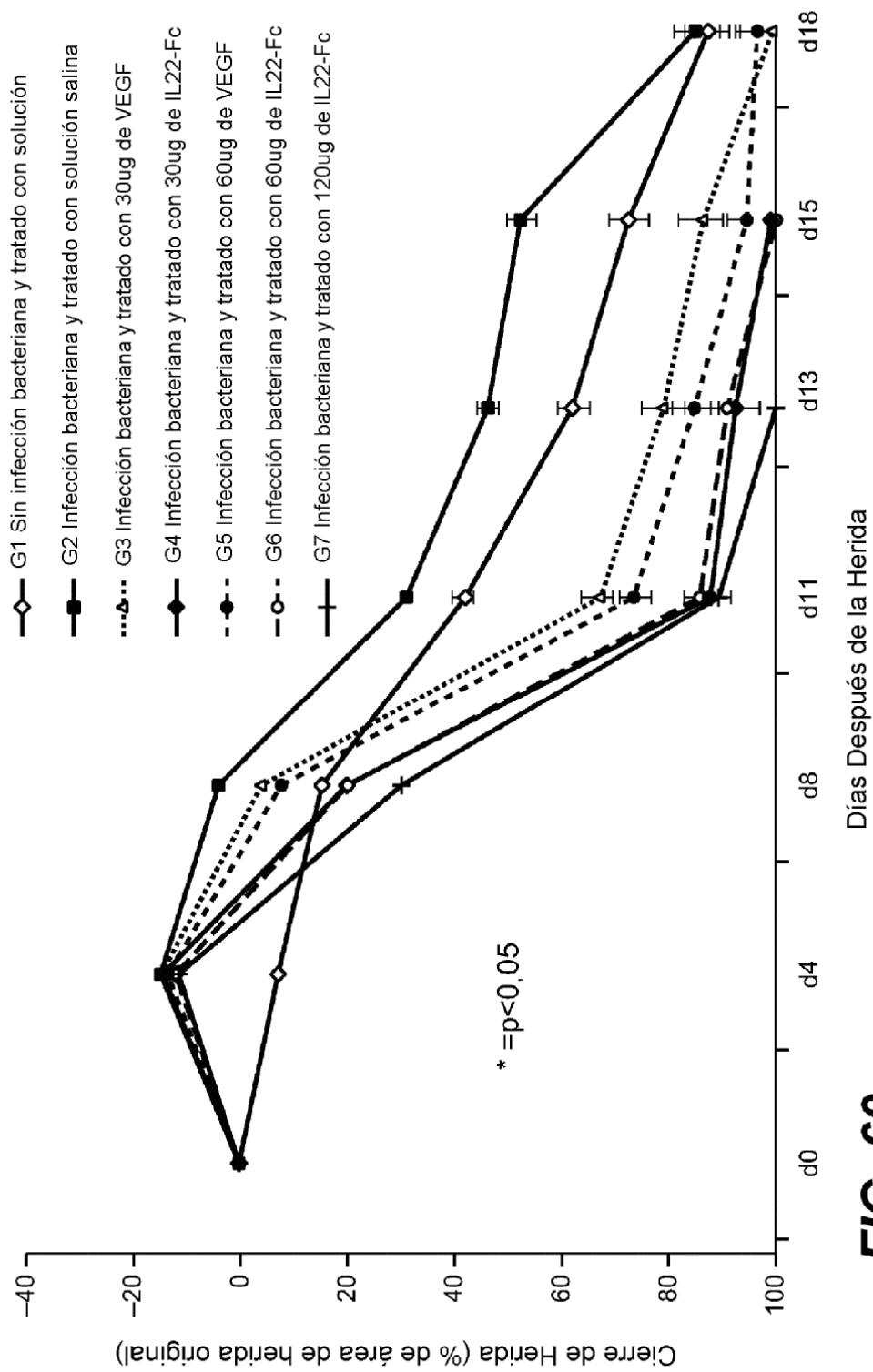


**FIG. 59B**

**FIG. 60**

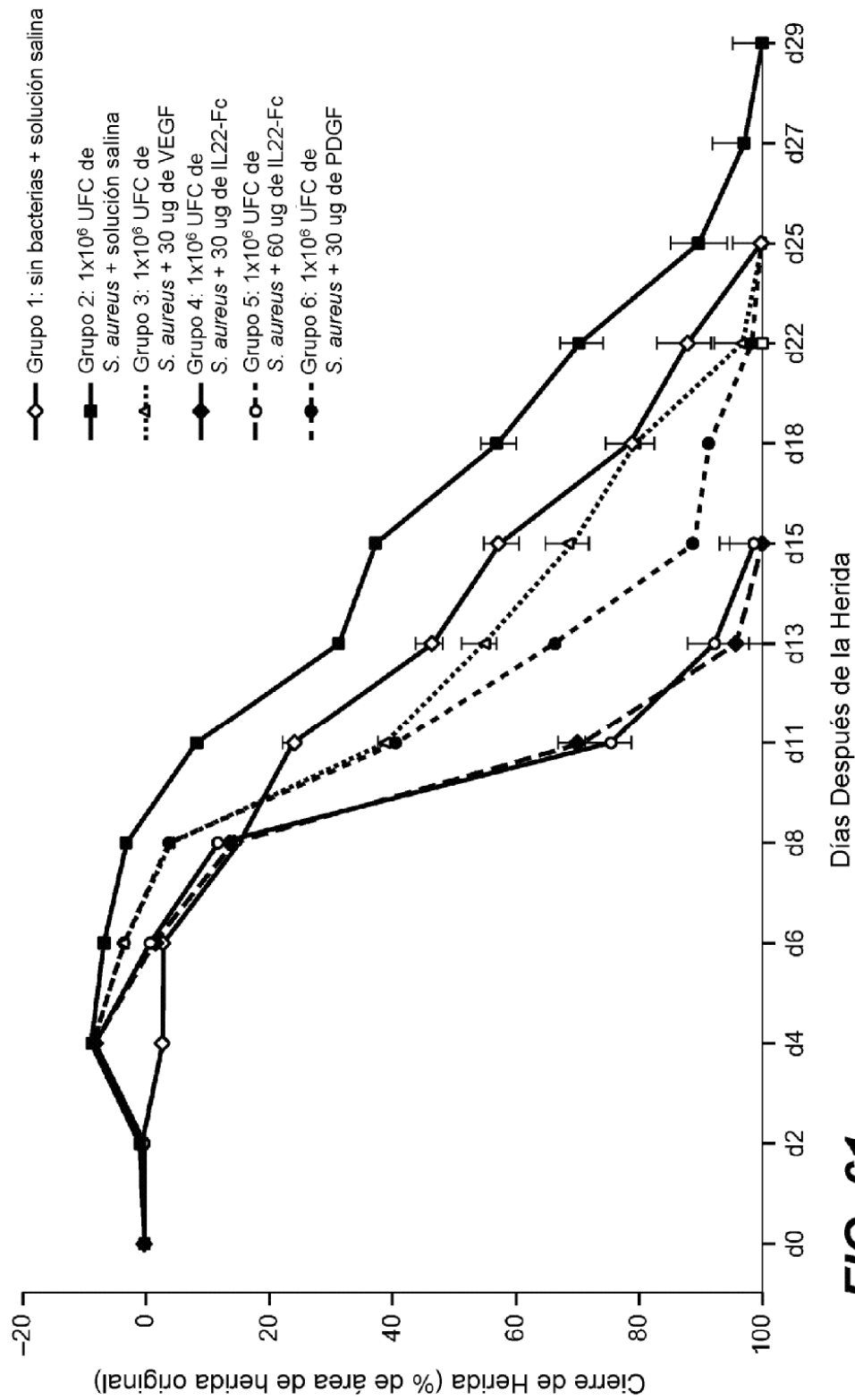


FIG. 61

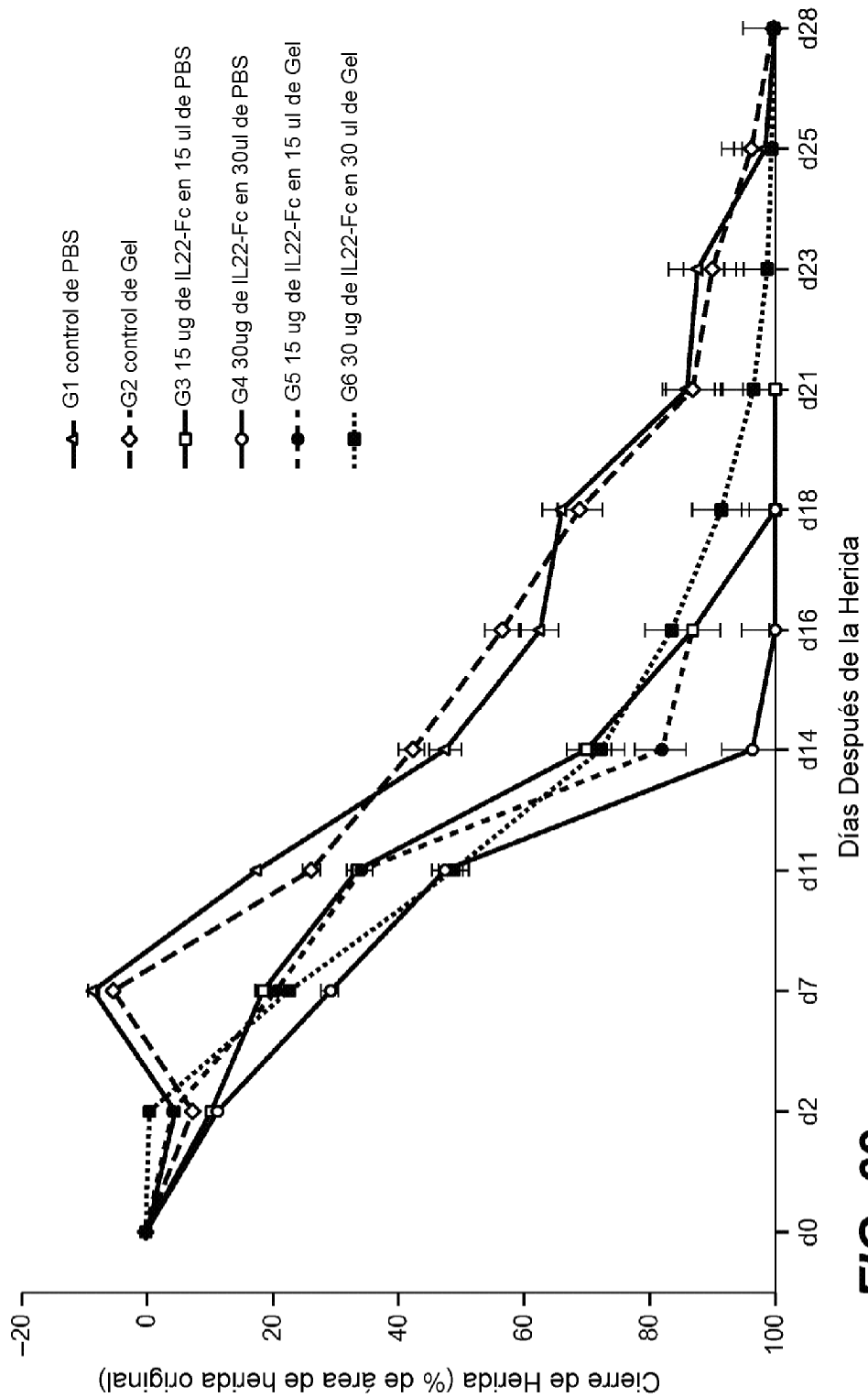


**FIG. 62**