(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090582 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.30

(22) Дата подачи заявки
2014.03.14

(51) Int. Cl. *C07K 14/54* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ IL-22, ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ IL-22 Fc И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/800,148; 61/800,795; 61/801,144; 61/821,062; 61/860,176**
(32) **2013.03.15; 2013.03.15; 2013.03.15; 2013.05.08; 2013.07.30**
(33) **US**
(62) **201591515; 2014.03.14**

(71) Заявитель:
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Шир Джастин, Оуян Вэньцзюнь, Стефанич Эрик Гари, Вандлен Ричард, Хаас Филип Е., Колумам Ганеш А., Ван Сяотин, Росс Джед, Ван Бругген Николас, Ли Уайн П. (US)

(74) Представитель:
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М., Глухарёва А.О., Гизатуллина Е.М., Строкова О.В., Лебедев В.В., Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к полипептидам IL-22, химерным белкам IL-22 Fc и агонистам IL-22, композиции, которая их содержит, способам получения и способам применения композиции для лечения заболеваний. Настоящее изобретение также относится к ассоциированным с рецептором IL-22 реагентам и способам их применения.

202090582 A2

202090582 A2

ПОЛИПЕПТИДЫ IL-22, ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ IL-22 Fc И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОПИСАНИЕ

В соответствии с настоящей заявкой испрашивается приоритет согласно предварительным заявкам на выдачу патента США с серийными номерами 61/800148, 61/800795 и 61/801144, все из которых были поданы 15 марта 2013 года, предварительной заявке на выдачу патента США с серийным номером 61/821062, поданной 8 мая 2013года, и предварительной заявке на выдачу патента США с серийным номером 61/860176, поданной 30 июля 2013 года, содержание всех из которых включено в настоящий документ при помощи ссылки в полном их объеме.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, поданный через EFS-Web и, таким образом, включенный в настоящий документ при помощи ссылки в полном его объеме. Указанная ASCII-копия, созданная 14 марта 2014 года, имеет название P5580R1-WO_Seq_Listing.txt и размер, составляющий 106763 байт.

Область техники

Настоящее изобретение относится к химерным белкам IL-22 и IL-22 Fc, агонистам IL-22, содержащим их композициям, и способам их получения, и способу их применения.

Уровень техники

Интерлейкин-22 (IL-22) является представителем семейства цитокина IL-10, который вырабатывается Th22 клетками, NK клетками, клетками-индукторами лимфоидной ткани (LTi), дендритными клетками и Th17 клетками. IL-22 связывается с рецепторным комплексом IL-22R1/IL-10R2, который экспрессируется в естественных клетках, таких как эпителиальные клетки, гепатоциты и кератиноциты, и в барьерных эпителиальных тканях некоторых органов, включая дерму, поджелудочную железу, кишечник и дыхательную систему.

IL-22 играет важную роль в защитных свойствах слизистых оболочек, опосредуя раннюю иммунную защиту от присоединения и перехода в скрытое состояния бактериальных патогенов. См. работу Zheng *et al.*, 2008, Nat. Med. 14:282-89. IL-22

активирует выработку противомикробных пептидов и провоспалительных цитокинов из эпителиальных клеток и стимулирует пролиферацию и миграцию эпителиальных клеток толстой кишки в кишечнике. См. работу Kumar *et al.*, 2013, J. Cancer, 4:57-65. При бактериальной инфекции у нокаутных по IL-22 мышей наблюдали ослабленную регенерацию кишечного эпителия, высокую бактериальную обсемененность и повышенную смертность. Kumar *et al.*, *ранее*. Аналогичным образом, инфицирование нокаутных по IL-22 мышей вирусом гриппа приводило в результате к сильной потере массы и ослабленной регенерации клеток трахеального и бронхиального эпителия. Таким образом, IL-22 играет провоспалительную роль в подавлении микробной инфекции, а также противовоспалительную защитную роль в регенерации эпителия при воспалительных реакциях. Необходимо еще многое определить в отношении биологического действия IL-22, активирующего патологическое воспаление и восстановление тканей. Противоречивые на вид сведения об эффектах IL-22 на эпителиальные клетки все еще до конца не понятны. Kumar *et al.*, *ранее*.

Регуляция противомикробных дефензинов, которая ограничивает бактериальную репликацию и распространение, будет способствовать стабилизации кишечной микробиоты путем уменьшения последующей выработки LPS и сохранения целостности слизистой оболочки. IL-22 положительно регулирует экспрессию острофазных белков, включая SAA, и способствует экспрессии ряда генов, ассоциированных с острыми воспалительными реакциями, включая IL-6, G-CSF и IL-1a. Системное введение IL-22 здоровым мышам также положительно регулирует LPS-связывающие белки до физиологически релевантных концентраций для нейтрализации LPS в ответ на бактериальную инфекцию.

Повышенную экспрессию IL-22 выявляют у больных с воспалительным нарушением кишечника (IBD). См., например, Wolk *et al.*, 2007, J. Immunology, 178:5973; Andoh *et al.*, 2005, Gastroenterology, 129:969. IBD, такие как болезнь Крона (CD) и язвенный колит (UC), предположительно являются результатом разрегулированной иммунной реакции на симбиотическую микрофлору, присутствующую в кишке. Cox *et al.*, 2012, Mucosal Immunol. 5:99-109. Как UC, так и CD являются комплексными заболеваниями, которые обычно встречаются у генетически восприимчивых индивидуумов, подвергающихся воздействию стимулов окружающей среды, которые пока слабо охарактеризованы. CD и UC опосредуются как общими, так и разными механизмами и характеризуются различными клинические признаками. См. работу Sugimoto *et al.* 2008, J. Clinical Investigation, 118:534-544.

При UC воспаление происходит главным образом в слизистой оболочке толстой кишки и прямой кишки, что приводит к развитию истощающих состояний, включая диарею, ректальное кровотечение и потерю веса. Есть основания полагать, что UC преимущественно обусловлен несоответствующей воспалительной реакцией хозяина на микроорганизмы кишечника, проникающие через поврежденный эпителиальный барьер (Xavier and Podolsky, 2007, Nature 448:427-434). Болезнь Крона характеризуется кишечной инфильтрацией активированных иммуноцитов и деформацией структуры кишечника. См. Wolk *et al.*, ранее.

На протяжении последних лет с переменным успехом был протестирован ряд лекарственных средств, основанных на различных стратегиях регуляции иммунной реакции, для лечения IBD, включая стероиды, иммуномодуляторы и антитела к воспалительным цитокинам (Pastorelli *et al.*, Expert opinion on emerging drugs, 2009, 14:505-521). Сложное разнообразие флоры кишечника вносит свой вклад в гетерогенность заболевания. Таким образом, существует необходимость в усовершенствованных терапевтических средствах от IBD.

Сердечно-сосудистое заболевание (CVD) является основной причиной смертности, которая отчасти является следствием атеросклеротического заболевания больших кровеносных сосудов. Атеросклероз является основной причиной случаев CVD и представляет собой медленное и прогрессирующее заболевание, которое является следствием гиперхолестеринемии и хронически воспаленных кровеносных сосудов. Атеросклеротические повреждения характеризуются липидной нагрузкой с инфильтрацией иммуноцитов, в особенности макрофагов и Т-клеток. В настоящее время допускают, что как врожденные, так и адаптивнные иммунные механизмы участвуют в прогрессировании и конечном тромбозе атерогенной бляшки (Ross, Am Heart J. 1999 Nov;138 (5 Pt 2):S419-20; Hansson 2005 N Engl J Med 352(16): 1685-95; Hansson and Hermansson 2011 Nature Immunology 12(3): 204-12).

Острый панкреатит (AP) является острым воспалительным процессом поджелудочной железы. Острое повреждение почек (AKI) представляет собой резкое ухудшение почечной функции, что приводит в результате к застою мочи и других азотистых продуктов выделения и дисрегуляции внеклеточного объема и электролитов. AKI ранее было известно как острая почечная недостаточность. Изменение отражает недавнее признание того, даже небольшие снижения почечной функции, которые не приводят в результате к очевидной недостаточности органа, имеют существенное клиническое значение и ассоциированы с повышенной частотой заболевания и

смертностью. Остается необходимость в усовершенствованном средстве для лечения от AP и AKI.

Метаболический синдром является сложным состоянием, характеризуемым набором факторов риска, которые вносят свой вклад в развитие тромбоза, гипертонии, дислипидемии и воспаления. Резистентность к инсулину и ожирение являются главными патогенными механизмами, лежащими в основе метаболического синдрома.

Резистентность к инсулину повышает риск возникновения CVD, так как она индуцирует эндотелиальную дисфункцию, которая, в комбинации с атерогенной дислипидемией, воспалением и гипертонией, вносит свой вклад в смертность от болезни коронарных артерий (CAD). Стойкая резистентность к инсулину также повышает шанс развития сахарного диабета 2 типа (T2DM), несмотря на то, что атерогенное состояние имело место за много лет до начала T2DM. Таким образом, вероятно, что естественное протекание CAD происходит таким же путем, как T2DM, но начинается намного раньше в жизни в скрытой форме, занимая более длинный период до клинического проявления, с наличием сахарного диабета или без него.

Термин метаболический эндотоксикоз был создан для описания состояния повышенного LPS в плазме, индуцированного, например, высококалорийным рацион с высоким содержанием жиров (HFD) (Cani et al. 2007. Diabetes 56(7): 1761-72). Мыши, которых кормили HFD, имеют повышенные уровни бактериального липополисахарида (LPS) в плазме крови, и это повышение, по-видимому, является прямым последствием повышенного жира, входящего в рацион (Cani et al. 2007 *ранее*; Cani et al. 2008 Diabetes 57(6): 1470-81; Ghoshal et al. 2009, J Lipid Res 50(1): 90-7). Существует убедительные свидетельства о том, что кишечная микробиота занимает неотъемлемую часть в балансе энергии хозяина и выходе питательных веществ рациона и метаболизме углеводов за счет модуляции функции эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника (Turnbaugh et al. 2009, J Physiol (Lond) 587(Pt 17): 4153-8; Manco et al. 2010, Endocr Rev 31(6): 817-44). Изменение кишечной микробиоты, которое происходит в результате несоответствующего состава жиров в рационе или избытка потребляемого количества калорий в рационе, является общепризнанным инициатором ожирения и резистентности к инсулину, известных осложнений сердечно-сосудистого заболевания. Липополисахариды обнаруживают во внешней мембране грам-отрицательных бактерий, и они выступают в роли источника эндотоксина, который может вызывать сильную иммунную реакцию (Barcia et al. Clin Infect Dis 41 Suppl 7: S498-503). Изменения популяции, видов и регионального распространения кишечной микробиоты

может привести к изменениям катаболизма LPS, а рацион с высоким содержанием жиров будет способствовать адсорбции LPS через кишечный барьер. При таких условиях повышенный LPS в системном кровотоке будет индуцировать хроническое слабое воспаление, активируя эндогенную защитную реакцию организма с повышением уровня липидов в плазме крови, которое при хроническом состоянии способствует развитию индуцированного рационом ожирения, резистентности к инсулину и атеросклерозу и последующим случаям CVD.

Сахарный диабет является серьезным метаболическим заболеванием, которое определяют по наличию постоянно повышенных уровней глюкозы в крови (гипергликемии). Это состояние гипергликемии является результатом относительного или абсолютного недостатка активности пептидного гормона, инсулина. Инсулин вырабатывается и секретируется β-клетками поджелудочной железы. Инсулин, как сообщают, способствует утилизации глюкозы, белковому синтезу и формированию и сохранению углеводной энергии в виде гликогена. Глюкоза сохраняется в организме в виде гликогена, формы полимеризированной глюкозы, которая может обратно преобразовываться в глюкозу для удовлетворения метаболических потребностей. При нормальных условиях инсулин секретируется как с интенсивностью основного обмена, так и с увеличенными интенсивностями после стимуляции глюкозой, все для поддержания метаболического гомеостаза посредством превращения глюкозы в гликоген. Сохраняется необходимость в новых эталонных способах лечения атеросклероза и предупреждения случаев CVD, метаболического синдрома, острого эндотоксикоза и сепсиса и связанных с инсулином нарушений.

Заживление ран является сложным процессом, включающим воспалительную фазу, фазу образования грануляционной ткани и фазу ремоделирования ткани (см., например, Singer and Clark, Cutaneous Wound Healing, *N. Engl. J. Med.* 341:738-46 (1999)). Такие явления запускаются цитокинами и факторами роста, которые высвобождаются в участке повреждения. Многие факторы могут осложнять или препятствовать нормальному полному заживлению ран. Например, такие факторы включают возраст, инфекцию, недостаточное питание, иммуносупрессию, медикаменты, облучение, сахарный диабет, заболевание периферических сосудов, системную болезнь, курение и стресс.

Для субъектов с сахарным диабетом широко распространенным осложнением является хроническое истощающее заболевание, развитие язвы диабетической стопы (также называемой раной). Хроническую язву определяют как рану, которая не

проходит упорядоченный и своевременный процесс восстановления с образованием анатомической и функциональной целостности (см., например, Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, *Arch. Dermatol.* 130:489-93 (1994)). По своей природе язва диабетической стопы является хронической раной (American Diabetes Association, Consensus development conference on diabetic foot wound care, *Diabetes Care*, 22(8):1354-60 (1999)). Поскольку кожа служит в качестве первичного барьера от окружающей среды, то открытая не поддающийся лечению рана может быть катастрофичной; может привести к общей инвалидизации (включая потерю конечности) и даже к смерти. Диабетическая стопа является предтечей для приблизительно 85% ампутаций нижних конечностей у людей с сахарным диабетом (см., например, Apelqvist, et al., What is the most effective way to reduce incidence of amputation in the diabetic foot? *Diabetes Metab Res. Rev.,* 16(1 Suppl.): S75-S83 (2000)). Таким образом, существует потребность в ускоренном или улучшенном заживлении ран, включая заживление диабетических ран.

Сущность изобретения

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к химерным белкам IL-22 Fc, содержащим их композициям и способам их применения.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc, который связывается с рецептором IL-22, при этом указанный химерный белок IL-22 Fc содержит полипептид IL-22, соединенный с Fc участком посредством линкера, причем Fc участок содержит шарнирный участок, домен CH2 IgG и домен CH3 IgG, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, предпочтительно по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:14, и причем Fc участок не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления остаток N297 домена CH2 заменен на глицин или аланин. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления остаток N297 заменен на Gly; в то время как в соответствии с другими вариантами осуществления остаток N297 заменен на Ala. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывание с рецептором IL-22 запускает проведение сигнала от рецептора IL-22, включая активацию STAT3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:12. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:12. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функции и/или активности химерного белка IL-22 Fc можно анализировать посредством способов *in vitro* или *in vivo*, например, анализа связывания рецептора IL-22, анализа активности репортерного гена люцеферазы Stat3 и т. д. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:12. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc, полученному посредством способа, включающего этап культивирования клетки-хозяина, способной экспрессировать химерный белок IL-22 Fc, в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка IL-22 Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно включает этап получения химерного белка IL-22 Fc из культуры клеток или культуральной среды. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомяка (CHO); в то время как в соответствии с другими вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc, содержащему полипептид IL-22, соединенный с Fc участком IgG посредством линкера, причем Fc участок содержит шарнирный участок, домен CH2 IgG и домен CH3 IgG, и причем Fc участок не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления шарнирный участок содержит

аминокислотную последовательность CPPCP (SEQ ID NO:31). В соответствии с другими определенными вариантами осуществления в Fc участке заменен остаток N297 и/или в Fc участке заменен остаток T299. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в домене CH2 заменен остаток N297, предпочтительно на глицин или аланин. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления остаток N297 заменен на глицин. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления остаток N297 заменен на аланин. В соответствии с еще одними вариантами осуществления остаток T299 заменен на Ala, Gly или Val. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления линкер составляет в длину 8-20 аминокислот, 8-16 аминокислот или 10-16 аминокислот.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc участок содержит домен CH2 и CH3 IgG1. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность DKTHT (SEQ ID NO:32). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GGGDKTHT (SEQ ID NO:41). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер составляет в длину по меньшей мере 11 аминокислот и содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33). В соответствии с другими определенными вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность 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) или KVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39). В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность 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) или KVDKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:65). В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления линкер не содержит аминокислотную последовательность GGS (SEQ ID NO: 45), GGGS (SEQ ID NO:46) или GGGGS (SEQ ID NO:47). В соответствии с отдельными вариантами осуществления химерный белок IL-22 IgG1 Fc содержит линкерную последовательность GGGSTHT (SEQ ID NO:63). В соответствии с другими определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12 или SE ID NO:14. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит домен CH2 и CH3 IgG4. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность SKYGPP (SEQ ID NO:43). В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность RVESKYGPP (SEQ ID NO:44). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ни один из линкеров не содержит аминокислотную последовательность GGS (SEQ ID NO:45), GGGS (SEQ ID NO:46) или GGGGS (SEQ ID NO:47). В соответствии с другими определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 или SE ID NO:10. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:8. В соответствии с другим вариантом осуществления IL-22 Fc химерный белок получен посредством способа, включающего этап культивирования клетки-хозяина, способной экспрессировать химерный белок IL-22 Fc, в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка IL-22 Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc получен посредством способа, который дополнительно включает этап получения химерного белка IL-22 Fc из культуры клеток или культуральной среды. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомяка (CHO). В соответствии с другими определенными вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей химерный блок IL-22 Fc, причем указанный химерный белок IL-22 Fc содержит полипептид IL-22, соединенный с Fc участком посредством линкера, причем Fc участок содержит шарнирный участок, домен CH2 IgG и домен CH3 IgG, и причем композиция характеризуется уровнем афукозилирования в домене CH2 не более 5%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровень афукозилирования составляет не более 2%, более предпочтительно менее 1%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровень афукозилирования измеряют посредством масс-спектрометрии. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления Fc участок содержит домен CH2 и CH3 IgG4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc участок содержит домен CH2 и CH3 IgG1. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления шарнирный участок содержит аминокислотную последовательность CPPCP (SEQ ID NO:31). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:26. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция получена посредством способа, включающего этапы культивирования клетки-хозяина, способной экспрессировать химерный белок IL-22 Fc, в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка IL-22 Fc, и получение химерного белка IL-22 Fc из культуры клеток или культуральной среды, причем композиция характеризуется уровнем афукозилирования в домене CH2 Fc участка, составляющим не более 5%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровень афукозилирования составляет не более 2%, более предпочтительно менее 1%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc получен посредством очистки, предпочтительно очистки фукозилированных компонентов от афукозилированных компонентов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc очищен посредством аффинной хроматографии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc или композиции, содержащей химерные белки IL-22 Fc, причем указанный химерный белок IL-22 Fc получен посредством способа, включающего этап культивирования клетки-хозяина, способной экспрессировать химерный белок IL-22 Fc, в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка IL-22 Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно включает этап получения химерного белка IL-22 Fc из культуры клеток или культуральной среды. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO; в то время как в соответствии с другими вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку *E. coli*.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей описанный в настоящем документе химерный белок IL-22 Fc. В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к

фармацевтической композиции, содержащей описанный в настоящем документе химерный белок IL-22 Fc и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция или фармацевтическая композиция содержит химерный белок IL-22 Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:26. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления композиция или фармацевтическая композиция содержит химерный белок IL-22 Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc получен при помощи *E. coli*. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления Fc участок химерного белка IL-22 Fc не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми дополнительными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc не индуцирует антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит субоптимальное количество терапевтического средства, такого как дексаметазон. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

Дополнительно, согласно со всеми без исключения аспектами по настоящему изобретению, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc может представлять собой димерный химерный белок IL-22 Fc (относительно IL-22); в то время как в соответствии с другими вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc может представлять собой мономерный химерный белок Fc (относительно IL-22).

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к мономерному химерному белку IL-22 Fc. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления мономерный химерный белок содержит химерное плечо IL-22 Fc и плечо Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерное плечо IL-22 Fc и плечо Fc содержит либо выступ, либо впадину в Fc участке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc участок химерного плеча IL-22 Fc (мономерная химера IL-22 Fc) содержит выступ, а Fc участок плеча Fc (мономерный Fc без соединения с IL-22) содержит впадину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc участок химерного плеча IL-22 Fc (мономерная химера IL-22 Fc) содержит впадину, а Fc участок плеча Fc (мономерный

Fc без соединения с IL-22) содержит выступ. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления мономерный химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61 и SEQ ID NO:62. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления Fc участок обоих плечей дополнительно содержит мутацию N297G. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления мономерный IL-22 Fc получен посредством способа, включающего этап культивирования одной или нескольких клеток-хозяев, содержащих одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, способных экспрессировать первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления способ дополнительно включает этап получения мономерного химерного белка IL-22 Fc из культуры клеток или культуральной среды. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку E. coli. В соответствии со смежным аспектом настоящее изобретение относится к композиции или фармацевтической композиции, содержащей мономерный химерный белок IL-22 Fc.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей описанный в настоящем документе химерный белок IL-22 Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеиновая кислота кодирует химерный белок IL-22 Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:26, предпочтительно SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:12, более предпочтительно SEQ ID NO:8. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления нуклеиновая кислота содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:25. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления нуклеиновая кислота содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:11, предпочтительно SEQ ID NO:7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:25. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит

полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:25, причем выделенная нуклеиновая кислота способна кодировать химерный белок IL-22 Fc, который способен связываться с IL-22R и/или запускать активность IL-22R, и причем Fc участок химерного белка IL-22 Fc не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:25, причем выделенная нуклеиновая кислота способна кодировать химерный белок IL-22 Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, 10, 12 или 14. В соответствии со смежными аспектами настоящее изобретение относится к векторам, содержащим описанную выше нуклеиновую кислоту, и к клетке-хозяину, содержащей такой вектор. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, включая без ограничения клетку *E. coli*. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, включая без ограничения клетку CHO. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин содержит вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный белок IL-22 Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

В соответствии с другим смежным аспектом настоящее изобретение относится к способам получения химерного белка IL-22 Fc, включающим этап культивирования клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка IL-22 Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно включает этап получения химерного белка IL-22 Fc из культуры клеток или культуральной среды. Химерный белок IL-22 Fc можно получить из культуры клеток или культуральной среды посредством любых известных из уровня техники способов выделения или очистки белка, включая без ограничения сбор культуральной среды, замораживание/оттаивание, центрифугирование, клеточный лизис, гомогенизацию,

фракционирование сульфатом аммония, HPLC и аффинную, гель-фильтрационную и ионообменную колоночную хроматографию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно включает этап удаления афукозилированного химерного белка IL-22 Fc. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления афукозилированный химерный белок IL-22 Fc удаляют посредством аффинной колоночной хроматографии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку E. coli. В соответствии с другими вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к композиции или фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:26. В соответствии с другими вариантами осуществления Fc участок химерного белка IL-22 Fc не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc участок химерного белка IL-22 Fc не является гликозилированным, в то время как полипептид IL-22 является гликозилированным. В соответствии с некоторыми такими вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc вырабатывается в клетках CHO. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc не индуцирует антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность. В соответствии с еще одними вариантами осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит дексаметазон или антагонист TNF. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления дексаметазон или антагонист TNF присутствует в субоптимальном количестве.

В соответствии с другими определенными вариантами осуществления фармацевтическая композиция, содержащая химерные белки IL-22 Fc, характеризуется уровнем афукозилирования в домене CH2, составляющим не более 5%, предпочтительно не более 2%, более предпочтительно менее 1%. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:26, предпочтительно SEQ ID NO:24. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc вырабатывается в CHO клетках. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления субъектом

является человек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическую композицию вводят системно или применяют местно. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно или применяют местно.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей описанные в настоящем документе полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гелеобразующее средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гелеобразующее средство представляет собой полисахарид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гелеобразующее средство представляет собой без ограничения метилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, блок-сополимер POE-POP, альгинат, гиалуроновую кислоту, полиакриловую кислоту, гидроксиэтилметилцеллюлозу или гидроксипропилметилцеллюлозу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полисахарид представляет собой целлюлозное средство, такое как без ограничения гидроксиэтилметилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гелеобразующее средство представляет собой гидроксипропилметилцеллюлозу. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция предназначена для местного применения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция для местного применения содержит полипептид IL-22. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция для местного применения содержит химерный белок IL-22 Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция для местного применения содержит полипептид IL-22 без химеры Fc.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способам лечения IBD у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления IBD представляет собой язвенный колит. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления IBD представляет собой болезнь Крона. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления Fc участок химерного белка

IL-22 Fc не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заменен остаток N297 и/или остаток T299 Fc участка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заменен остаток N297 Fc участка. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления остаток N297 заменен на Gly или Ala, предпочтительно Gly. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления заменен остаток T299, предпочтительно на Val, Gly или Ala. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или EQ ID NO:14, предпочтительно SEQ ID NO:8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc вырабатывается в клетке E. coli или CHO. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно или применяют местно.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способам лечения при помощи полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc по настоящему изобретению любого одного или комбинации из следующих заболеваний: сахарного диабета II типа, сахарного диабета II типа с патологическим ожирением, ран (включая диабетические раны и диабетические язвы), ожогов, язв (включая пролежневую язву и венозную язву), реакции трансплантат против хозяина (GVHD), атеросклероза, сердечно-сосудистого заболевания, метаболического синдрома, эндотоксикоза (острого и легкого), сепсиса, острого коронарного заболевания сердца, гипертонии, дислипидемии, ожирения, гипергликемии, нарушений липидного метаболизма, гепатита, острого гепатита, почечной недостаточности, острой почечной недостаточности, острого повреждения почек, хронической почечной недостаточности, трансплантации трупных почек с отсроченной функцией трансплантата, контраст-индуцированной нефропатии, панкреатита, острого панкреатита, печеночного фиброза и легочного фиброза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления острый панкреатит может представлять собой заболевание с легкой - умеренной - тяжелой степенью тяжести. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления острый панкреатит включает заболевание после ERCP (эндоскопической ретроградной холангиопанкреатографии). В соответствии с некоторыми дополнительными вариантами осуществления больной, подлежащий лечению от вышеупомянутого заболевания, нуждается в изменении его липидного профиля HDL/LDL, который

полипептид IL-22 или химерные белки IL-22 Fc могут изменять у больного с повышением HDL и понижением LDL. В соответствии со смежным аспектом настоящее изобретение относится к применениям полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc при приготовлении лекарственного препарата для лечения любого одного или комбинаций из вышеупомянутых заболеваний.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способам ингибирования микробной инфекции в кишечнике или сохранения бокаловидных клеток в кишечнике в течение микробной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающим этап введения субъекту фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению. В соответствии с другими смежными аспектами настоящее изобретение относится к способам повышения целостности эпителиальных клеток, заживления слизистой оболочки, пролиферации эпителиальных клеток, дифференцировки эпителиальных клеток, миграции эпителиальных клеток или заживления эпителиальных ран в кишечнике у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эпителиальная клетка представляет собой кишечную эпителиальную клетку.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения сердечно-сосудистого состояния, причем состояние включает патологию с формированием атеросклеротических бляшек. Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc. Сердечно-сосудистое состояние включает, например, болезнь коронарных артерий, коронарное микрососудистое заболевание, инсульт, заболевание сонной артерии, заболевание периферических артерий и хроническое заболевание почек. Способ может включать дополнительное замедление прогрессирования формирования атеросклеротических бляшек. Способ может дополнительно включать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств субъекту для предупреждения или лечения сердечно-сосудистого состояния.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения метаболического синдрома. Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc. Способ может дополнительно включать уменьшение одного или

нескольких факторов риска, ассоциированных с метаболическим синдромом, в том числе одного или нескольких из центрального ожирения, гипергликемии, дислипидемии и гипертонии. Способ может дополнительно включать уменьшение уровня бактериального липополисахарида (LPS) у субъекта. Способ может дополнительно включать введение одного или нескольких дополнительных средств субъекту для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу задержки или замедления прогрессирования атеросклероза. Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc. Способ может дополнительно включать введение одного или нескольких дополнительных средств субъекту для задержки или замедления прогрессирования атеросклероза.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу предупреждения проявления признака атеросклероза. Способ включает введение терапевтически эффективного количества полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc субъекту, подверженному риску развития атеросклероза, причем полипептид IL-22 химерного белка IL-22 Fc эффективен против развития признака атеросклероза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект был выявлен как подверженный риску развития сердечно-сосудистого состояния. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект генетически подвержен риску развития сердечно-сосудистого состояния. В соответствии с одним или несколькими вариантами осуществления признаки атеросклероза включают скопление бляшек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления признаки атеросклероза включают воспаление сосудов. Способ может дополнительно включать введение одного или нескольких дополнительных средств субъекту для предупреждения развития признаков атеросклероза.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения одного или нескольких из острого эндотоксикоза и сепсиса. Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc. Способ может дополнительно включать введение одного или нескольких дополнительных средств субъекту для лечения одного или нескольких из острого эндотоксикоза и сепсиса.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к способу для ускорения или улучшения заживления ран, или как первого, так и второго, у субъекта.

Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc или агониста IL-22. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рана представляет собой хроническую рану. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления рана представляет собой инфицированную рану. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект страдает сахарным диабетом, включая субъекта с сахарным диабетом II типа. В соответствии с одним или несколькими вариантами осуществления рана представляет собой язву диабетической стопы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтически эффективное количество полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc или агониста IL-22 применяют до полного закрытия раны. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение является системным; и в соответствии с другими вариантами осуществления введение является местным применением. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22, химерный белок IL-22 Fc или агонист IL-22 находится в составе для местного применения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состав для местного применения содержит полипептид IL-22 без химеры Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления агонист IL22 выбран из группы, состоящей из полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc, агониста IL-22, полипептида IL-19, химерного белка IL-19 Fc, агониста IL-19, полипептида IL-20, химерного белка IL-20 Fc, агониста IL-20, полипептида IL-24, химерного белка IL-24 Fc, агониста IL-24, полипептида IL-26, химерного белка IL-26 Fc, агониста IL-26 и агониста IL-22R1. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления агонист IL-22 выбран из группы, состоящей из полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc, агониста IL-22, полипептида IL-20, химерного белка IL-20 Fc, агониста IL-20, полипептида IL-24, химерного белка IL-24 Fc и агониста IL-22R1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления агонист IL-22R1 представляет собой агонистическое антитело к IL22R1.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способам лечения метаболического синдрома, включающим этап введения нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества одного или нескольких агонистов IL-22. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления агонист IL22 выбран из группы, состоящей из полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc, агониста IL-22, полипептида IL-19, химерного белка IL-19 Fc, агониста IL-19, полипептида IL-20,

химерного белка IL-20 Fc, агониста IL-20, полипептида IL-24, химерного белка IL-24 Fc, агониста IL-24, полипептида IL-26, химерного белка IL-26 Fc, агониста IL-26 и агониста IL-22R1. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления агонист IL-22 выбран из группы, состоящей из полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc, агониста IL-22, полипептида IL-20, химерного белка IL-20 Fc, агониста IL-20, полипептида IL-24, химерного белка IL-24 Fc и агониста IL-22R1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления агонист IL-22R1 представляет собой агонистическое антитело к IL22R1. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления метаболический синдром представляет собой сахарный диабет. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления метаболический синдром представляет собой сахарный диабет II типа.

В соответствии с другим вариантом осуществления субъекту вводят химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22 или химерный белок IL22 Fc вводят внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно, системно или применяют местно.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления таких аспектов Fc участок химерного белка IL-22 Fc не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заменен остаток N297 и/или остаток T299 Fc участка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заменен остаток N297 Fc участка. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления остаток N297 заменен на Gly или Ala, предпочтительно Gly. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления заменен остаток T299, предпочтительно на Val, Gly или Ala. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или EQ ID NO:14, предпочтительно SEQ ID NO:8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc вырабатывается в E. coli. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно или применяют местно.

В соответствии с другими определенными вариантами осуществления фармацевтическая композиция, содержащая химерные белки IL-22 Fc, характеризуется уровнем афукозилирования в домене CH2, составляющим не более 5%,

предпочтительно не более 2%, более предпочтительно менее 1%. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:26, предпочтительно SEQ ID NO:24. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc вырабатывается в CHO клетках. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно или применяют местно.

В соответствии с еще одними вариантами осуществления описанных выше аспектов N-гликан, прикрепленный к Fc участку химерного белка IL-22 Fc, ферментативно удаляют посредством гликолитического фермента. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гликолитическим ферментом является пептид-N-гликозидаза (ПНГаза). В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления субъектом является человек.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение также относится к применениям описанного в настоящем документе химерного белка IL-22 Fc при приготовлении лекарственного препарата для лечения IBD, включая UC и CD, у нуждающегося в этом субъекта. В соответствии со смежным аспектом настоящее изобретение относится к применениям описанного в настоящем документе химерного белка IL-22 Fc при приготовлении лекарственного препарата для ингибирования микробной инфекции в кишечнике или сохранения бокаловидных клеток в кишечнике в течение микробной инфекции у нуждающегося в этом субъекта. В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к применениям описанного в настоящем документе химерного белка IL-22 Fc при приготовлении лекарственного препарата для повышения целостности эпителиальных клеток, пролиферации эпителиальных клеток, дифференцировки эпителиальных клеток, миграции эпителиальных клеток или заживления эпителиальных ран в кишечнике у нуждающегося в этом субъекта. В соответствии с другими смежными аспектами настоящее изобретение относится к применениям полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc при приготовлении лекарственного препарата для лечения сердечно-сосудистого состояния, метаболического синдрома, атеросклероза, острого повреждения почек, острого панкреатита, ускорения, стимуляции или улучшения заживления ран, включая без ограничения заживление хронической раны,

диабетической раны, инфицированной раны, пролежневой язвы или язвы диабетической стопы, у нуждающегося в этом субъекта.

Все без исключения варианты осуществления можно комбинировать, если контекст очевидно не предполагает обратное. Все без исключения варианты осуществления можно применять в отношении всех без исключения аспектов по настоящему изобретению, если контекст очевидно не предполагает обратное.

Конкретные варианты осуществления по настоящему изобретению станут очевидными из приведенного далее более подробного описания некоторых предпочтительных вариантов осуществления и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На **фигуре 1** показано выравнивание аминокислотных последовательностей зрелого IL-22 от различных видов млекопитающих: человека (номер доступа GenBankQ9GZX6, SEQ ID NO:4, шимпанзе (номер доступа GenBankXP_003313906, SEQ ID NO:48), орангутана (номер доступа GenBank XP_002823544, SEQ ID NO:49), мыши (номер доступа GenBank Q9JJY9, SEQ ID NO:50) и собаки (номер доступа GenBank XP_538274, SEQ ID NO:51).

На **фигуре 2** показаны результаты масс-спектрометрии статуса гликозилирования Fc участка обычного человеческого моноклонального IgG1 Fc (секция A), химеры IL-22 IgG1 Fc, содержащей линкерную последовательность EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33, секция B), EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40, секция C) и GGGDKTHT (SEQ ID NO:41, секция D) и химеры IL-22 IgG4 Fc, содержащий линкерную последовательность RVESKYGPP, без мутации или с мутацией N297G (SEQ ID NO:44, секции E и F, соответственно), и химеры IL-22 IgG1 Fc, содержащий линкерную последовательность EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40), с мутацией N297G (секция G).

На **фигуре 3** показано выравнивание последовательностей химеры человеческий IL-22 IgG4 Fc (N297G, полноразмерная последовательность Fc с Lys на C-конце, SEQ ID NO:16, без Lys SEQ ID NO:8), химеры IL-22 IgG1 Fc (N297G, полноразмерная последовательность Fc с Lys на C-конце, SEQ ID NO:20, без Lys SEQ ID NO:12) и IL-22 (SEQ ID NO:4). Показанная последовательность IL-22 является зрелой формой без лидерной последовательности. Шарнирная последовательность CPPCP (SEQ ID NO:31) показана в рамке, далее идут домены CH2 и CH3. Отмечены замена N297G и необязательный остаток Lys на C конце.

На **фигуре 4** представлен график, на котором видны результаты STAT3 люциферазного анализа. Активность люциферазы, стимулируемую химерой IL-22 IgG4 Fc или химерой IL-22 IgG1 Fc, измеряли в клетках 293, экспрессирующих IL-22R человека. Из результатов видно, что у химеры IL-22 IgG4 и IL-22 IgG1 Fc наблюдали схожую активность *in vitro*.

На **фигуре 5** показаны терапевтические эффекты мышиного химерного белка IL-22 Fc в индуцированной декстран сульфат натрием (DSS) мышиной модели IBD. Мышиный химерный белок IL-22 Fc улучшал гистологию толстой кишки у мышей с IBD, индуцированной DSS (на фигуре **5B**), и улучшение преобразовывали в пониженный показатель гистологии толстой кишки (фигура **5C**). Обработка химерным белком IL-22 Fc приводила в результате к уменьшенной потере массы у мышей в ходе обработки по сравнению с дексаметазоном, в настоящее время наилучшим стандартом терапии в этой модели (фигура **5A**).

На **фигуре 6** показана скорость сывороточного клиренса человеческих химерных белков IL-22 IgG4 и IgG1 Fc у яванского макака, которому вводили дозу 0,15 мг/кг и 1,5 мг/кг в день 0 и день 7.

На **фигуре 7** показаны уровни в сыворотке трех генов IL-22R, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов, у яванских макаков после введения дозы в количестве 0,15 мг/кг и 1,5 мг/кг на день 1 и день 8 (такой же режим дозирования, как на день 0 и день 7 на фигуре 6). На фигуре **7A** показаны дозозависимые повышения сывороточного амилоида А (SAA), на фигуре **7B** показаны дозозависимые повышения липополисахарид-связывающего белка (LPS-BP), на фигуре **7C** показаны дозозависимые повышения RegIII/панкреатит-ассоциированного белка (PAP или PancrePAP) после введения hIL-22 Fc.

На **фигуре 8** показаны результаты микроКТ с высокой разрешающей способностью, на которых виден объем атеросклеротических бляшек в дуге аорты и брахиоцефальной артерии 8 месячной Ldlr-/-Apobec1-/- мыши на рационе с высоким содержанием жиров.

На **фигуре 9** показано, что Ldlr-/-Apobec1-/- мыши были чувствительными к стимулам посредством рациона, и у них наблюдали значительно повышенный уровень атеросклероза, согласно результатам измерения микроКТ (**A**), но лишь незначительно повышенные уровни LDL в сыворотке (**B**).

На **фигуре 10** показана реакция Ldlr-/-Apobec1-/- мышей на стимул, который вызывал острое слабое воспаление, из которой видно увеличение MCP-1(**A**) и IL-6 (**B**) в

сыворотке крови, превышающее наблюдаемые у мышей C57 дикого типа (wt) и которое сопровождается ухудшением функции сосудов, по результатам оценки поток-опосредованного расширения и инфузии нитроглицерина (**C**).

На **фигуре 11** показано что постоянное воздействие эндотоксина приводит к дислипидемии (**A**) и большему объему бляшек (**B**) и нестабильности (**C**).

На **фигуре 12** показано, что уровень глюкозы в крови натощак уменьшался в группе, обработанной IL-22-Fc, по сравнению с контролями (**A**), а клиренс глюкозы улучшался в результате обработки IL-22-Fc, что видно из теста на толерантность к глюкозе (**B, C**).

На **фигуре 13** показано, что после обработки посредством IL-22-Fc происходит уменьшение общего холестерина. У Ldlr-/-Apobec1-/- мышей общий холестерин повышался как в условиях натощак, так и в условиях после приема пищи и уменьшался в группе IL-22-Fc по сравнению с контролями, по результатам измерения в конце периода обработки (**A**). Уровни триглециридов в плазме крови также уменьшались при обработке посредством IL-22-Fc со значительным уменьшением в состоянии после приема пищи (**B**).

На **фигуре 14** показано, что гиперлипидемия, наблюдаемая у Ldlr-/-Apobec1-/- мыши, уменьшалась после обработки посредством IL-22-Fc. LDL уменьшался как в состоянии натощак, так и в состоянии после приема пищи (**A**), HDL возрастал (**B**), а соотношение LDL/HDL уменьшалось как в состоянии натощак, так и в состоянии после приема пищи (**C**). vLDL уменьшался в условиях после приема пищи (**D**). Результаты HDL (**E**), LDL (**F**) и соотношения LDL/HDL (**G**) регистрировали спустя 5 дней для мышей, получавших две дозы.

На **фигуре 15** показано, что уровни LPS в плазме крови уменьшались после обработки посредством IL-22-Fc.

На **фигуре 16** показаны улучшенные результаты измерения функции эндотелия по реактивности сосудов после обработки посредством IL-22-Fc.

На **фигуре 17** изображены результаты количественного анализа объема бляшек, выполненного при помощи микроКТ с контрастированием на посмертных образцах иссеченной дуги аорты, восходящего и нисходящего отделов аорты (**A**), брахиоцефальной артерии (**B**) и клапана аорты (**C**).

На **фигуре 18** показаны значения массы тела (**A**) и потребление пищи (**B**) после обработки посредством IL-22-Fc.

На **фигуре 19** изображено схематичное отображение режима обработки мышиной модели сахарного диабета.

На **фигурах 20A-C** показаны масса тела и уровни глюкозы в сыворотке крови у *db/db* мышей, у которых наблюдали, что IL-22-Fc значимо уменьшал глюкозу у страдающих ожирением мышей.

На **фигуре 21** показано, что обработка посредством IL-22Fc улучшала толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину по результатам теста на толерантность к глюкозе (GTT). $p < 0{,}05$

На **фигурах 22A-B** показано, что обработка посредством IL-22Fc улучшала чувствительность к инсулину по результатам теста на толерантность к глюкозе (ITT), которую измеряли по уровню глюкозы мг/дл (A) и % уменьшения глюкозы (B).

На **фигуре 23** показано, что IL-22Fc повышал экспрессию инсулина в островках. (**A**) Зеленый отображает глюкагон, красный отображает инсулин. Круговая область, обрамленная красной линией, показывает площадь островка. Масштабная шкала, 50 мкм. (**B**) Средняя интенсивность окрашивания инсулина. (**C**) Средняя интенсивность окрашивания глюкагона. (**D**) Уровни инсулина после приема пищи у мышей, которых кормили HFD. (**E**) Уровни инсулина натощак у мышей, которых кормили HFD. (**F**) IL-22 Fc обращал невосприимчивость к инсулину у мышей, которых кормили HFD. $^{**}P<0{,}01$, $^{***}P<0{,}001$. Величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигурах 24A-B** показаны результаты количественного анализа интенсивности инсулинового сигнала у животных, подвергнутых обработке посредством IL-22-Fc.

На **фигурах 25A-B** показано, что инсулин-положительная площадь повышалась у животных, подвергнутых обработке посредством IL-22-Fc, по сравнению с контролем.

На **фигуре 26** показаны гистологические срезы, на которых видно снижение перипортального жирового гепатоза при обработке посредством IL-22-Fc (**B**) по сравнению с контролем (**A**).

На **фигурах 27A-B** показаны результаты оценки IL-22R в HFD-индуцированной толерантности к глюкозе. (**A**) Уровни глюкозы (мг/дл) спустя время после ip инъекции глюкозы. (**B**) Результаты расчета общей площади под кривой (AUC).

На **фигуре 28** показана масса мышей KO по рецептору IL-22 по сравнению с однопометным контролем.

Фигуры 29A-D: Ldlr -/-, Apobec1 -/- (dko) мышей обрабатывали при помощи 50 мкг IL-22Fc или 50 мкг антител к антигену амброзии (n=6 на группу) в течение 48 часов. LPS в сыворотке крови уменьшался на 50% (p=0,0052), а LDL/HDL в сыворотке

крови уменьшалось на 30% (p=0,049) у мышей, подвергнутых обработке посредством IL-22Fc.

На **фигуре 30** показана нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующей нативный IL-22 человека (SEQ ID NO:70).

На **фигуре 31** показана аминокислотная последовательность, полученная из кодирующей последовательности, показанной на фиг. 30 (SEQ ID NO:71).

На **фигуре 32A** показана аминокислотная последовательность химерного белка мышиный IL-22-мышиный-IgG2a (SEQ ID NO:73). На **фигуре 32B** показана нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный белок мышиный IL-22-мышиный-IgG2a (SEQ ID NO:72).

На **фигуре 33** показано, что отсутствие передачи сигнала через IL-22R приводит в результате к задержке заживления раны. Раны IL-22R KO мышей заживали со значимой задержкой (p=0,0018 на день 10 и p=0,005 на день 12) по сравнению контролем однопометных мышей WT.

На **фигурах 34A-C** изображена раневая щель отдельных мышей (n=10) на дни 10, 12 и 15. Показаны иллюстративные фотоснимки ран как для IL-22R KO мышей, так и для WT на день 14 (**D**).

На **фигуре 35** показано сравнение заживления ран между контрольными мышами WT (BKS) и страдающими сахарным диабетом *db/db* мышами. (**A**) Заживление ран у db/db мышей в значительной степени задерживалось на протяжении периода исследования, и раны не заживали полностью даже на день 28. Гистограмма в (**B**) отображает уровень экспрессии IL-22 в виде кратности изменения у мышей дикого типа или *db/db* мышей спустя несколько дней после рассечения раны.

Фигура 36 является схематическим представлением схемы исследования для тестирования IL-22-Fc у *db/db* мышей суммарно в 3 группах (n=7). Антитело к антигену амброзии применяли в качестве контрольного Fc-белка, а антитело к FGFR1 применяли в качестве положительного контроля для регуляции глюкозы.

На **фигуре 37** показан IL-22 Fc-нормализованный уровень глюкозы после приема пищи у подвергаемых обработке мышей по сравнению с контролями от дня 4 до дня 27. Уровни глюкозы регистрировали при помощи глюкометра Onetouch®.

На **фигуре 38** графически показаны результаты сравнительного измерения в раневой щели IL-22-Fc по сравнению с 2 контрольными антителами: антителом к антигену амброзии и антителом к FGFR1. Каждая точка на графике представляет среднее значение для 7 мышей/группа.

На **фигурах 39A-D** показаны результаты измерений отдельной раневой щели на дни 15, 19, 21 и день 27. Показаны фотографии иллюстративных мышей на день 27 (**E**).

Фигура 40 является схематическим представлением схемы исследования для тестирования местного применения дозы по отношению к системному введению дозы IL-22-Fc по сравнению с обработкой контрольным антителом у db/db мышей; суммарно 3 группы (n=7).

На **фигуре 41A-B** графически показаны результаты сравнительного измерения раневой щели местного применения дозы по отношению к системному введению дозы IL-22-Fc с местной обработкой контрольным Fc. Антитело к антигену амброзии применяли в качестве контрольного Fc антитела. Каждая точка на графике представляет среднее значение для 7 мышей/группа.

На **фигуре 42** при помощи фотографий показана хирургически удаленная ткань раны от иллюстративных мышей, на фотографиях показаны как вид сверху, так и вид с обратной стороны на день 22 от IL-22-Fc (**B**) и контрольного антитела (**A**).

На **фигуре 43A** показана стратегия создания IL-22R KO мышей. На **фигуре 43B** показаны результаты RT-PCR экспрессии иРНК IL-22Ra1 в толстой кишке от IL-22R KO и WT мышей. На **фигуре 43 C** показаны результаты RT-PCR экспрессии иРНК Reg3b в толстой кишке от IL-22R KO и WT мышей через 2 дня после введения инъекцией однократной дозы IL-22 Fc или контрольного IgG. ***P<0,001. Величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 44** показаны результаты, из которых видно, что у страдающих ожирением мышей возникали дефектные реакции с IL-22. (**A-D**) Лимфоциты в дренирующих лимфатических узлах *db/db* (A-B), DIO (C-D) и контрольных мышей, иммунизированных посредством OVA/CFA, анализировали в отношении экспрессии IL-22 на день 7 посредством проточной цитометрии. Числа на графиках FACS в (A, C) являются процентом IL-22$^+$ клеток среди CD4$^+$ Т-клеток. (**E-F**) *db/db*, худым контролям, нормальным мышам, которых кормили HFD и кормовым рационом, вводили инъекцией флагеллин или PBS. Сыворотку крови собирали через 2 часа. ELISA от IL-22 от *db/db* и худых контролей (E) и мышей (F), которых кормили HFD и кормовым рационом. Показанные данные типичны для трех (A-B) или двух (C-F) независимых экспериментов. N=4 во всех экспериментах. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 45** показаны нарушения выработки IL-17 и IL-22 у мышей с дефицитом по лептиновому сигналу. (**A-B**) Экспрессию IL-17A и IL-22 анализировали

на день 7 в виде процента среди CD4+ клеток у *db/db* и *ob/ob* мышей, иммунизированных посредством OVA/CFA. (**C**) Результаты ELISA IL-22 из надосадочной жидкости культуры очищенных наивных WT CD4+ Т-клеток, которых стимулировали в условиях выработки IL-22 с рекомбинантным мышиным лептином (1 мкг/мл) или без него. (**D**) Результаты ELISA IL-22 из надосадочной жидкости Rag2 KO спленоцитов, простимулированных посредством IL-23 с рекомбинантным мышиным лептином (1 мкг/мл) или без него. (**E**) Результаты ELISA сывороточного IL-22 от *ob/ob* или худых контролей через 2 часа после стимуляции флагеллином. *P<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001, величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 46** показаны результаты, из которых видно, что восприимчивость *db/db* (*ob/ob*) мышей к инфицированию *C. rodentium* была ассоциирована с нарушенной выработкой IL-22 и восстанавливалась под воздействием эндогенного IL-22–Fc. (**A**) Экспрессия иРНК IL-22 в толстых кишках от WT, *db/db* и *ob/ob* мышей (n=5) после инфицирования *C. rodentium*. (**B**) Масса тела и (**C**) выживаемость *db/db* и худых контрольных мышей (n=10), инфицированных *C. rodentium*. (**D-E**) Гистология толстой кишки худых контрольных (D) и *db/db* (E) мышей на день 10, на которой видна гиперплазия эпителия, шелушение энтероцитов в просвет кишки, бактериальные колонии (стрелки) и отек подслизистой оболочки (вертикальная полоска). Горизонтальная полоска, 200 мкм. (**F**) Клиническая оценка, определенная посредством гистологии толстой кишки (n=5). (**G-H**) Бактериальная нагрузка у *db/db* и худых контрольных мышей (n=5) в печени (G) и селезенке (H) на день 10. (**I**) Результаты ELISA IgG к *C. rodentium* у худых контрольных и *db/db* мышей (n=5) на день 10. (**J**). Выживаемость худых контрольных или *db/db* мышей (n=10), подвергнутых обработке посредством IL-22–Fc или контрольного IgG после инфицирования. Показанные данные типичны для трех независимых экспериментов. **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001, величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 47** показаны результаты, из которых видно, что диабетические нарушения уменьшались в результате обработки посредством IL-22–Fc. (**A-D**) Мышей, которых кормили HFD, обрабатывали посредством IL-22–Fc два раза в неделю (n=10). (A) Уровень глюкозы в крови на день 20 (после приема пищи) и день 21 (16-часовое голодание). (B) Масса тела на день 30. (C) Тест на толерантность к глюкозе на день 21. (C) Тест на толерантность к инсулину на день 28. Показанные данные типичны для двух независимых экспериментов. **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001, величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 48** показаны результаты, из которых видно, что IL-22 предупреждает развитие диабетических нарушений у мышей, которых кормили HFD. (**A**) масса тела, (**B**) уровень глюкозы в крови, (**C**) тест на толерантность к глюкозе на день 23, (**D**) уровень глюкозы в крови на день 23 после 16 часов голодания и (**E**) накопление брюшного жира на день 25. *P<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001, величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 49** показаны результаты, из которых видно, что IL-22 регулирует метаболический синдром посредством множества механизмов. (**A-C**) Две группы *db/db* мышей (n=8) кормили пищей без ограничения и обрабатывали посредством контрольного IgG или IL-22–Fc два раза в неделю. Одну группу *db/db* мышей (n=8) кормили ограниченной пищей, которая совпадала с потреблением пищи группы, подвергнутой обработке посредством IL-22–Fc, и обрабатывали посредством контрольного IgG. Кумулятивное потребление пищи первых восьми дней у мышей, которых кормили без ограничения, показано на (A), уровень глюкозы в крови на (B) и результаты теста на толерантность к глюкозе на день 25 на (C). На (**D-E**) показаны уровни PYY у *db/db* (D) и HFD (E) мышей, подвергнутых обработке посредством IL-22–Fc или контрольного IgG, на день 0 и день 2. Сыворотку крови собирали на день 2 перед 2-й обработкой и на день 5 и анализировали на PYY. На (**F**) показан уровень LPS в сыворотке крови *db/db* мышей, подвергнутых обработке посредством IL-22–Fc или контрольного IgG, на протяжении 3 недель. (**G-I**) IL-22R KO (n=9) и WT (n=6) мышей кормили посредством HFD, начиная с 6 недельного возраста. Результаты массы тела показаны на (G), результаты теста на толерантность к глюкозе через 3 месяца кормления HFD показаны на (H) и результаты теста на толерантность к инсулину через 4 месяца кормления HFD показаны на (I). Показанные данные типичны для двух (A-C) или трех (D-I) независимых экспериментов. *P<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001, величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 50** показаны результаты потребления ограниченной пищи в экспериментах с одинаковым питанием. Три группы *db/db* мышей кормили и подвергали обработке как указано на фигуре 49A. Измеряли кумулятивное потребление пищи.

На **фигуре 51** показаны результаты, из которых видна улучшенная посредством IL-22 функция печени и уменьшенное накопление жира. (**A**) db/db мыши, подвергнутые обработке посредством IL-22 Fc или контрольного IgG, как на фигуре 20A. Ферменты печени измеряли через один месяц. (**B-C**) Мышей, которых кормили HFD, подвергали

обработке посредством IL-22 Fc или контрольного IgG, как на фигуре 47A. Ферменты печени (B) и накопление брюшного жира (C) измеряли через один месяц. **P<0,01, ***P<0,001, величины ошибки, стандартная ошибка среднего. (**D-H**) Мышей кормили HFD на протяжении 10 недель, а затем подвергали обработке посредством IL-22 Fc или контроля два раза в неделю на протяжении 6 недель. (D) Экспрессия гена липидного метаболизма из белой жировой ткани. (E) Сывороточный триглицерид, глицерин и свободная жирная кислота. (F) Печеночный триглицерид. (G) Печеночный холестерин. (H) Триглицерид в белой жировой ткани. (**I-J**) db/db мыши, подвергнутые обработке посредством IL-22 Fc или контрольного IgG на протяжении 4 недель. (I) Печеночный триглицерид. (J) Триглицерид в белой жировой ткани. *P<0,05. Величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 52** показаны результаты, из которых видно, что IL-22 повышал секрецию инсулина у β-клеток. *db/db* мышей обрабатывали посредством IL-22 Fc, как показано на фигуре 20A, поджелудочные железы собирали на день 30 и красили на инсулин и глюкагон. (**A**) Процент площади островка в общей площади поджелудочной железы. (**B**) Процент площади β-клеток в общей площади островка. (**C**) Процент площади α-клеток в общей площади островка.

Фигура 53: у IL-22 KO мышей не развивалось нарушение толерантности к глюкозе при HFD. IL-22 KO мышей кормили HFD, начиная с 6-месячного возраста. Тест на толерантность к глюкозе осуществляли через 3 месяца после HFD. Величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 54** показаны результаты, из которых видна восприимчивость *ob/ob* мышей к инфицированию *C. rodentium*: (**A**) масса тела и (**B**) выживаемость *ob/ob* и худых мышей (n = 10), инфицированных *C. rodentium*; (**C-D**) гистология толстой кишки контрольных худых (C) и *ob/ob* мышей (D) на день 8, на которой видны гиперплазия эпителия, шелушение энтероцитов в просвет кишки, бактериальные колонии (стрелками) и отек подслизистой оболочки (вертикальная полоса) (горизонтальная полоса, 200 мкм); (**E**) клиническая оценка, определенная по гистологии толстой кишки (n = 5); и (**F-G**) бактериальная нагрузка у *ob/ob* и контрольных худых мышей (n = 5) в печени (F) и селезенке (G) на день 8. *P < 0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Величины ошибки, стандартная ошибка среднего.

На **фигуре 55** показаны результаты *db/db* мышей, подвергнутых обработке посредством IL-22 Fc, IL-20 Fc или IL-24 Fc, (**A**) массы тела, (**B**) уровня глюкозы в сыворотке крови и (**C**) теста на толерантность к глюкозе на 20 день обработки.

На **фигурах 56A и B** показаны результаты сравнения эффективности заживления ран у *db/db* мышей, подвергнутых обработке посредством VEGF или IL-22 Fc.

На **фигурах 57A-E** показано индуцирование выработки цитокинов или хемокинов посредством IL-22 Fc в реконструированном эпидермисе.

На **фигуре 58** показаны результаты сравнения закрытия раны при помощи модели раны с наложением шины у мышей дикого типа и *db/db* мышей с инфицированием *S. aureus* или без него.

На **фигуре 59 A и B** показаны результаты сравнения эффективности заживления ран между VEGF и IL-22 Fc в модели инфицированной раны с наложением шины.

На **фигуре 60** показаны результаты сравнения эффективности заживления ран между VEGF и IL-22 Fc в различных концентрациях в модели инфицированной раны с наложением шины.

На **фигуре 61** показаны результаты сравнения эффективности заживления ран между VEGF, PDGF и IL-22 Fc в различных концентрациях в модели инфицированной раны с наложением шины.

На **фигуре 62** показано, что IL-22 Fc ускорял заживление ран в растворе, а также в гелевом составе в модели раны с наложением шины.

Подробное описание изобретения

Все упомянутые в настоящем документе публикации, патенты и патентные заявки, таким образом, однозначно включены в настоящий документ при помощи ссылки для всех целей.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к белку IL-22 или химерным белкам IL-22 Fc, композиции, которая их содержит, и способам их применения. В частности, настоящее изобретение относится к применению химерных белков IL-22 Fc или полипептида IL-22 при предупреждении и лечении IBD, атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний и состояний, характеризующихся формированием атеросклеротических бляшек, метаболического синдрома, легкого и острого эндотоксикоза и сепсиса, острого повреждения почек, острого панкреатита, умеренного острого панкреатита и связанных с инсулином нарушений. Дополнительно, настоящее изобретение относится к применению химерных белков IL-22 Fc или

полипептидов IL-22 при предупреждении и лечения язвы диабетической стопы, ускорения заживления ран и, в частности, заживления диабетических ран.

В соответствии с одним аспектом полагают, что настоящее изобретение относится к первому раскрытию, в котором показано лечение полипептидом IL-22 сердечно-сосудистого заболевания как такового. Данные в настоящем документе подтверждают идею о том, что полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc могут уменьшать рост атеросклеротических бляшек, уменьшать частоту разрыва атеросклеротических бляшек и уменьшать эндотоксикоз. Настоящее изобретение, в частности, пригодно при лечении субъектов, страдающих от метаболического синдрома, слабого или острого эндотоксикоза, сепсиса и связанных с инсулином нарушений, таких как резистентность к инсулину (нечувствительность к инсулину), которые нуждаются в изменении их липидного профиля HDL/LDL, что может определить доктор или лечащий врач. В настоящей заявке приведены данные, которые указывают на то, что полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc могут повышать уровень липопротеинов высокой плотности (HDL) и понижать уровень липопротеинов низкой плотности (LDL) у таких субъектов, которые страдают от метаболического синдрома. Данные, без привязки к какой-либо теории, также указывают на то, что кишечный LPS является фактором, приводящим к эндотоксикозу и атеросклерозу. Мыши, подвергнутые обработке химерным белком mIL-22 Fc, имели уменьшенную гиперлипидемию, уменьшенную толерантность к глюкозе с восстановленной функцией сосудов, и такие изменения завершались уменьшением атеросклеротической бляшки. Полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc может ослаблять прогрессирование сердечно-сосудистого заболевания.

Кроме того, сахарный диабет является хроническим нарушением, влияющим на углеводный, жировой и белковый метаболизм у животных. Сахарный диабет является основной причиной слепоты, почечной недостаточности и ампутаций нижних конечностей у взрослых и является основным фактором риска сердечно-сосудистого заболевания и инсульта. Сахарный диабет I типа (или инсулин-зависимый сахарный диабет ("IDDM") или ювенильный сахарный диабет) составляет приблизительно 10% от всех случаев сахарного диабета. Заболевание характеризуется прогрессивной потерей функции секреции инсулина бета-клетками поджелудочной железы. Такая характеристика также присуща неидиопатическому, или "вторичному", сахарному диабету, который берез свое начало в заболевании поджелудочной железы. Сахарный диабет I типа ассоциируют со следующими клиническими объективными признаками

или симптомами: например, постоянно повышенной концентрацией глюкозы в плазме крови или гипергликемией; полиурией; полидипсией и/или гиперфагией; хроническими микрососудистыми осложнениями, такими как ретинопатия, нефропатия и невропатия; и макрососудистыми осложнениями, такими как гиперлипидемия и гипертония, которые могут привести к потере зрения, почечному заболеванию конечной стадии, ампутации конечности и инфаркту миокарда.

Сахарный диабет II типа (инсулиннезависимый сахарный диабет или NIDDM, также называемый сахарным диабетом II типа) является метаболическим нарушением (или метаболическим синдромом), включающим дисрегуляцию глюкозного метаболизма и нарушенную чувствительность к инсулину. Сахарный диабет II типа обычно развивается в зрелом возрасте и ассоциирован с неспособностью организма утилизировать или вырабатывать инсулин в достаточном количестве. В дополнение к резистентности к инсулину, наблюдаемой в тканях-мишенях, больные, страдающие от сахарного диабета II типа, имеют относительный дефицит инсулина, который заключается в том, что больные имеют уровни инсулина, ниже прогнозируемых для заданной концентрации глюкозы в плазме крови. Сахарный диабет I типа характеризуется следующими клиническими объективными признаками или симптомами: например, постоянно повышенной концентрацией глюкозы в плазме крови или гипергликемией; полиурией; полидипсией и/или гиперфагией; хроническими микрососудистыми осложнениями, такими как ретинопатия, нефропатия и невропатия; и макрососудистыми осложнениями, такими как гиперлипидемия и гипертония, которые могут привести к потере зрения, почечному заболеванию конечной стадии, ампутации конечности и инфаркту миокарда.

I. <u>Определения</u>

Если не указано иное, подразумевают, что все термины из области техники, обозначения и другая применяемая в настоящем документе научная терминология имеют значения, традиционно понимаемые специалистами в настоящей области, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях термины с традиционно понимаемыми значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для удобства наведения справок, и включение таких определений в настоящий документ не следует обязательно истолковывать как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимают в настоящей области техники.

В рамках настоящей заявки, если не указано иное, используемые методики можно найти в любом из нескольких хорошо известных источников: *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), и Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

В зависимости от конкретного случая, процедуры, включающие применение коммерчески доступных наборов и реактивов, обычно осуществляют в соответствии с определенными производителем протоколами и/или параметрами, если не указано иное. Таким образом, перед описанием настоящих способов и применений необходимо донести к сведению, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными методологией, протоколами, линиями клеток, видами или родами животных, конструкциями и реактивами, поскольку они, конечно же, могут изменяться. Также следует понимать, что применяемая в настоящем документе терминология предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не направлена на ограничение объема настоящего изобретения, который будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Применяемые в настоящем документе формы единственного числа включают и формы множественного числа, если контекст очевидно не указывает на иное. Например, ссылка на “выделенная пептид” означает один или несколько выделенных пептидов.

По всему настоящему описанию и в формуле изобретения будет понятно, что слово "содержат" или такие варианты, как "содержит" или "содержащий", подразумевает включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любых других целых чисел или группы целых чисел.

Применяемый в настоящем документе термин “химерный белок IL-22 Fc”, или “химерный белок IL-22”, или “химерный белок IL-22 Ig” относится к химерному белку, в котором белок или полипептид IL-22 соединены напрямую или опосредованно с Fc участком IgG. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению содержит человеческий белок или полипептид IL-22, соединенный с человеческим Fc участком IgG. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления человеческий белок IL-22 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4. Тем не менее, понятно, что настоящим изобретением предусмотрены варианты минорных

последовательностей, такие как вставки, делеции, замены, особенно консервативные аминокислотные замены IL-22, или Fc, которые не влияют на функцию и/или активность химерного белка IL-22 или IL-22 Fc. Химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению может связываться с рецептором IL-22, что может привести к проведению сигнала от рецептора IL-22. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc способен связываться с рецептором IL-22 и/или способен привести к проведению сигнала от рецептора IL-22. Функции и/или активности химерного белка IL-22 Fc можно проанализировать посредством способов, известных из уровня техники, включая без ограничения, ELISA, анализ связывания лиганд-рецептор и STAT3-люциферазный анализ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc, который связывается с рецептором IL-22, связывание может привести к проведению сигнала от рецептора IL-22, причем указанный химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:14, и причем Fc участок не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления Fc участок химерного белка IL-22 не обладает эффекторными активностями (например, не связывается с FcγIIIR), или у него наблюдают существенно более низкую эффекторную активность, чем у полного антитела (например, дикого типа) IgG. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления Fc участок химерного белка IL-22 Fc не вызывает цитотоксичность, такую как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Если не указано иное, “химерный белок IL-22”, “химера IL-22 Fc”, “химерный белок IL-22 Ig”, “химерный белок IL-22 Fc” или “IL-22 Fc” применяют взаимозаменяемо по всей настоящей заявке.

Применяемый в настоящем документе термин “IL-22”, или “полипептид IL-22”, или “белок IL-22” в широком смысле относится к любому нативному IL-22 от любого относящегося к млекопитающим источника, включая приматов (например, людей) и грызунов (например, мышей и крыс), если не указано иное. Термин охватывает “полноразмерный”, непроцессированный IL-22, а также любые формы IL-22, которые получаются в результате процессинга в клетке. Например, настоящим изобретением охватывается как полноразмерный IL-22, содержащий N-терминальную лидерную последовательность, так и зрелая форма IL-22. Лидерная последовательность (или

сигнальный пептид) может представлять собой эндогенную лидерную последовательность IL-22 или экзогенную лидерную последовательность другого секретируемого млекопитающим белка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лидерная последовательность может быть получена от эукариотического или прокариотического секретируемого белка. Термин также охватывает встречающие в природе варианты IL-22, например, сплайс-варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность иллюстративного человеческого IL-22 показана в SEQ ID NO:4 (зрелая форма, без сигнального пептида). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотная последовательность полноразмерного белка IL-22 с эндогенной лидерной последовательностью представлена в SEQ ID NO:71; в то время как, в соответствии с другим вариантом осуществления аминокислотная последовательность зрелого белка IL-22 с экзогенной лидерной последовательностью предоставлена в SEQ ID NO:2. Также настоящим изобретением предусмотрены варианты минорной последовательности, особенно консервативные аминокислотные замены IL-22, которые не влияют на функцию и/или активность IL-22 (например, связывание с рецептором IL-22). На фигуре 1 показано выравнивание аминокислотных последовательностей зрелого IL-22 от нескольких иллюстративных видов млекопитающих. Звездочки указывают на высококонсервированные аминокислотные остатки среди видов, которые, по-видимому, важны для функций и/или активностей IL-22. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению содержит полипептид IL-22, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO:4. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления белок IL-22 на 95% или более идентичен последовательности SEQ ID NO:71, на 96% или более идентичен последовательности SEQ ID NO:71, на 97% или более идентичен последовательности SEQ ID NO:71; на 98% или более идентичен последовательности SEQ ID NO:71; на 99% или более идентичен последовательности SEQ ID NO:71. Описанные в настоящем документе полипептиды IL-22 можно выделить из множества источников, как например, из ткани человека или из другого источника, или получить посредством рекомбинантных или синтетических способов.

Термин “рецептор IL-22” или “IL-22R” относится к гетеродимеру, состоящему из IL-22R1 и IL-10R2 или встречающихся в природе их аллельных вариантов. См. Ouyang *et al.*, 2011, Annu. Rev. Immunol. 29:159-63. IL-10R2 повсеместно экспрессируются многими типами клеток, а IL-22R1 экспрессируется только в естественных клетках, таких как эпителиальные клетки, гепатоциты и кератиноциты. IL-22R1 также известен как IL-22Ra1 или IL-22Rα1. IL-22R1 можно объединить в пару с другими полипептидами с формированием гетеродимерных рецепторов для других представителей семейства IL-10, например, IL-20 или IL-24. См., например, Ouyang et al., 2011, ранее.

"Полипептид с нативной последовательностью IL-22" или "полипептид с нативной последовательностью IL-22R" относится к полипептиду, содержащему такую же аминокислотную последовательность, как и соответствующий полипептид IL-22 или IL-22R природного происхождения. Такие полипептиды IL-22 или IL-22R с нативной последовательностью можно получить из природной среды или можно получить посредством рекомбинантных или синтетических способов. Термины, в частности, охватывают встречающиеся в природе укороченные или секретированные формы специфического полипептида IL-22 или IL-22R (например, IL-22, у которого отсутствует ассоциированный с ним сигнальный пептид), встречающиеся в природе вариантные формы (например, формы, полученные в результате альтернативного сплайсинга) и встречающиеся в природе аллельные варианты полипептида. В соответствии с различными вариантами осуществления по настоящему изобретению раскрываемые в настоящем документе полипептиды IL-22 или IL-22R с нативной последовательностью представляют собой полипептиды со зрелой или полноразмерной нативной последовательностью. Иллюстративный полноразмерный нативный человеческий IL-22 показан на фигуре 30 (ДНК, SEQ IDNO:70) и фигуре 31 (белок, SEQ ID NO:71). Старт- и стоп-кодоны показаны жирным шрифтом и подчеркнуты на фигуре 30. Несмотря на то, что раскрываемые в прилагаемых фигурах полипептидные последовательности IL-22 и IL-22R показаны как начинающиеся с метиониновых остатков, обозначенных в настоящем документе как аминокислотное положение 1, вероятно и возможно, что другие метиониновые остатки, расположенные до или после аминокислотного положения 1 на фигурах, можно использовать в качестве начального аминокислотного остатка для полипептидов IL-22 или IL-22R.

"Вариант IL-22", "вариант IL-22R", "вариантный полипептид IL-22 полипептид" или "вариантный полипептид IL-22R" означают описанный выше активный полипептид

IL-22 или IL-22R, который имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичную полноразмерной нативной последовательности IL-22 или полипептидной последовательности IL-22R. Как правило, полипептидный вариант IL-22 или IL-22R будет иметь аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 81% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 82% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 83% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 84% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 85% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 86% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 87% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 88% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 89% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 90% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 91% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 92% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 93% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 94% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 95% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 96% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 97% идентична, альтернативно по меньшей мере приблизительно на 98% идентична и альтернативно по меньшей мере приблизительно на 99% идентична полноразмерной или зрелой нативной последовательности IL-22 или полипептидной последовательности IL-22R.

Термин “Fc участок”, “домен Fc” или “Fc” относится к С-концевому антиген-несвязывающему участку иммуноглобулиновой тяжелой цепи, которая содержит по меньшей мере часть константного участка. Термин включает нативные Fc участки и вариантные Fc участки. В соответствии с конкретными вариантами осуществления Fc участок тяжелой цепи IgG человека длиться от Cys226 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Тем не менее, С-концевой лизин (Lys447) Fc участка может присутствовать или может отсутствовать, без влияния на структуру или стабильность Fc участка. Если в настоящем документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в IgG или Fc участке соответствует системе нумерации EU для антител, также называемой EU-нумерация, которая описана в работе Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc участок относится к константному участку тяжелой цепи иммуноглобулина IgG, содержащему шарнирный участок (начинающийся с Cys226), домен CH2 и домен CH3 IgG. Применяемый в настоящем документе термин “шарнирный участок” или “шарнирная последовательность” относится к аминокислотной последовательности, расположенной между линкером и доменом CH2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления шарнирный участок содержит аминокислотную последовательность CPPCP (SEQ ID NO:31). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления шарнирный участок для химерного белка IL-22 IgG4 Fc содержит последовательность CPPCP (SEQ ID NO:31), последовательность, которая встречается в нативном шарнирном участке IgG1, для облегчения димеризации. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления Fc участок начинается на шарнирном участке и продолжается до C-конца тяжелой цепи IgG. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления Fc участок представляет собой Fc участок человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления Fc участок содержит домен CH2 и CH3 IgG4. В соответствии с некоторыми другими определенными вариантами осуществления Fc участок содержит домен CH2 и CH3 IgG1. Как описано в разделе Примеры, заявителями, к удивлению, было обнаружено, что у химерного белка IL-22 IgG4 Fc наблюдали более превосходящие фармакокинетические свойства, чем у химерного белка IL-22 IgG1 Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления домен CH2 IgG начинается с Ala 231. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления домен CH3 начинается с Gly 341. Понятно, что C-концевой остаток Lys человеческого IgG может необязательно отсутствовать. Также понятно, что объемом настоящего изобретения предусмотрены консервативные аминокислотные замены в Fc участке без влияния на требуемую структуру и/или стабильность Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления IL-22 соединен с Fc участком посредством линкера. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления линкер представляет собой пептид, который присоединяет C-конец IL-22 к Fc участку, как описано в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в линкерном и/или шарнирном участке присутствуют нативные последовательности IgG для минимизации и/или во избежание риска иммуногенности. В соответствии с другими вариантами осуществления для

облегчения получения в нативные последовательности можно внести варианты минорных последовательностей. Также в объем настоящего изобретения подпадают химерные конструкции IL-22 Fc, содержащие экзогенный линкер или шарнирные последовательности, у которых наблюдают высокую активность (измеренную, например, посредством люциферазного анализа). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, которая составляет в длину 8-20 аминокислот, 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 или 16 аминокислот. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность DKTHT (SEQ ID NO:32).

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления линкер не содержит последовательность Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:45), Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:46) или Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:47).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит полипептид IL-22, соединенный с Fc участком посредством линкера. Термин “соединенный с” или “гибридизированный с” относится к ковалентной связи, например, пептидной связи, сформированной между двумя фрагментами.

Термин “афукозилирование”, “афукозилированный”, “дефукозилирование” или “дефукозилированный” относится к отсутствию или удалению коровой фукозы с N-гликана, прикрепленного к домену CH2 в Fc.

Неожиданно заявителями было обнаружено, что химерные белки IL-22 IgG1 Fc, в отличие от других химерных белков Fc или антител, содержащих Fc, характеризовались повышенными уровнями (например, 30%) афукозилирования в N-гликанах, прикрепленных к Fc участку. N-гликаны, прикрепленные к домену CH2 в Fc, являются гетерогенными. Антитела или химерные белки Fc, образующиеся в CHO клетках, фукозилируются посредством молекул, обладающих фукозилтрансферазной активностью. См. Shoji-Hosaka *et al.*, J. Biochem. 2006, 140:777-83. В норме, в сыворотке крови человека можно выявить небольшой процент встречающихся в природе афукозилированных IgG. N-гликозилирование Fc является важным для связывания с FcγR; а афукозилирование N-гликана повышает связывающую способность Fc в отношении FcγRIIIa. Повышенное связывание FcγRIIIa может усилить антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), которая может быть преимущественной для некоторых терапевтических целей, включающих применение антител, в которых необходима цитотоксичность. См. Shoji-Hosaka *et al.*,

ранее. Такая усиленная эффекторная функция, тем не менее, может быть пагубной в случае, когда Fc-опосредованная цитотоксичность не является необходимой, как например, в случае химеры IL-22 Fc.

Известно, что у IgG4 Fc наблюдают меньшую эффекторную активность, чем у IgG1 Fc. Заявители неожиданно обнаружили, что химерный белок IL-22 IgG4 Fc также характеризовался высокими уровнями афукозилирования в Fc участке. Высокий уровень афукозилированного N-гликана, прикрепленного к Fc в IgG4, может повышать нежелательную эффекторную активность.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc, в котором Fc участок или домен CH2 не является гликозилированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт N-гликозилирования в домене CH2 является мутированным для предупреждения гликозилирования.

В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления гликозилирование в домене CH2 Fc участка можно устранить путем изменения консенсусного сайта гликозилирования, т. е., Asn в положении 297, за которым идет любой другой аминокислотного остаток (в случае человеческого IgG, Ser) и Thr (см. фигуру 3). Сайт гликозилирования можно изменить при помощи аминокислотных вставок, делеций и/или замен. Например, один или несколько аминокислотных остатков можно встроить между Asn и Ser или между Ser и Thr для изменения исходного сайта гликозилирования, причем вставки не восстанавливают сайт N-гликозилирования. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления остаток N297 (например, N-гликозилированный сайт в Fc, см. фигуру 3) в домене CH2 человеческого IgG Fc подвергнут мутации для устранения сайта гликозилирования. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления остаток N297 заменен на Gly, Ala, Gln, Asp или Glu. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления остаток N297 заменен на Gly или Ala. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления остаток N297 заменен на Gly. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления остаток T299 можно заместить на другую аминокислоту, например, Ala, Val или Gly. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления мутации, которые в результате приводят к агликозилированному Fc, не затрагивают структуру и/или стабильность химерного белка IL-22 Fc.

В соответствии со смежным аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения IBD, включая UC и CD, способам ингибирования бактериальной инфекции в кишечнике, и способам улучшения целостности эпителия, пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток в кишечнике, и способам лечения метаболических нарушений или метаболического синдрома, сахарного диабета II типа, атеросклероза и заживления диабетических ран у нуждающегося в этом больного, включающим введение больному фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем Fc участок не является гликозилированной.

В соответствии со следующим аспектом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей химерные белки IL-22 Fc, имеющие низкий уровень афукозилирования в Fc участке или не имеющие его вовсе. В частности, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей химерные белки IL-22 Fc, имеющие общий уровень афукозилирования в Fc участке, составляющий не более 10%, предпочтительно не более 5%, более предпочтительно не более 2% и наиболее предпочтительно менее 1%. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способам лечения IBD, включая UC и CD, способам ингибирования бактериальной инфекции в кишечнике, и способам улучшения целостности эпителия, пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток в кишечнике, и способам лечения метаболических нарушений, сахарного диабета II типа, сахарного диабета II типа с патологическим ожирением, реакции трансплантат против хозяина (GVHD), атеросклероза, сердечно-сосудистого заболевания, метаболического синдрома, эндотоксикоза (острого и слабого), сепсиса, острого коронарного заболевания сердца, гипертонии, дислипемии, ожирения, гипергликемии, нарушений липидного метаболизма, гепатита, острого гепатита, почечной недостаточности, острой почечной недостаточности, острого повреждения почек, хронической почечной недостаточности, панкреатита, острого панкреатита, печеночного фиброза и легочного фиброза, раны, инфицированной раны, ускорения заживления ран, включая заживление диабетических ран у нуждающегося в этом больного, включающим введение больному фармацевтической композиции, содержащей химерные белки IL-22 Fc, имеющие уровень афукозилирования в Fc участке, составляющий не более 10 %, предпочтительно не более 5%, более предпочтительно не более 2% и наиболее предпочтительно менее 1%.

Термин “% афукозилирования” относится к уровню афукозилирования в Fc участке в композиции химерных белков IL-22 Fc. % афукозилирования можно измерить при помощи масс-спектрометрии (MS) и представить как процент афукозилированных гликановых компонентов (компоненты без фукозы на одном домене Fc (минус 1) и на обоих доменах Fc (минус 2)) по сравнению со всей совокупностью химерных белков IL-22 Fc. Например, % афукозилирования можно рассчитать как процент объединенной площади под пиком минус 1 фукоза и пиком минус 2 фукозы от общей площади всех гликановых компонентов, анализируемых посредством MS, например, определяемых посредством масс-спектрометра Agilent 6520B TOF, как описано на фигуре 2 и в показанных ниже примерах. Уровень афукозилирования можно измерить посредством любых других подходящих способов, известных из уровня техники, включая без ограничения HPLC-Chip Cube MS (Agilent) и обращенно-фазовую HPLC. % афукозилирования композиции IL-22 Fc можно применять в качестве фактора для определения того, будет ли композиции с некоторой вероятностью приводить к развитию неприемлемого уровня ADCC, неподходящего для поставленных целей. Соответственно, в соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления композиция содержит химерные белки IL-22 Fc, имеющие уровень афукозилирования, составляющей не более 10%, предпочтительно не более 5%, более предпочтительно не более 3% и наиболее предпочтительно не более 1%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция содержит химерные белки IL-22 Fc, имеющие уровень афукозилирования, составляющий не более 10%, не более 9%, не более 8%, не более 7%, не более 6%, не более 5%, не более 4%, не более 3%, не более 2% или не более 1%.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления необходимый уровень афукозилирования IL-22 Fc композиции можно достичь посредством способов, известных из уровня техники, в том числе без ограничения с посредством очистки. Например, фукозилированные компоненты в композиции можно обогащать при помощи аффинной хроматографией со смолами, конъюгированными с фукоза-связывающим компонентом, таким как антитело или лектин, специфичный к фукозе, особенно фукозе, присутствующей на 1-6 связи. См., например, Kobayashi *et al*, 2012, J. Biol. Chem. 287:33973-82. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления фукозилированные компоненты можно обогатить и отделить от афукозилированных компонентов при помощи антитела специфичного к фукозе в колонке для аффинной хроматографии. Альтернативно или дополнительно,

афукозилированные компоненты можно отделять от фукозилированных компонентов по различной аффинности связывания с FcγRIIIa при помощи аффинной хроматографии.

В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит Fc участок, в котором остаток N297 в домене CH2 является мутированным. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления остаток N297 заменен на Gly или Ala, предпочтительно на Gly. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления остаток N297 удален. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc, содержащий Fc, имеющий аминокислотную замену в N297, является агликозилированным или не является гликозилированным. Применяемый в настоящем документе термин “агликозилированный” относится к белку или части представляющего интерес белка, который не является гликозилированным. Например, химерный белок IL-22 Fc с агликозилированным Fc участком можно получить посредством мутагенеза остатка N297 в домене CH2 в Fc участке.

В соответствии с другим вариантом осуществления N-гликан, прикрепленный к остатку N297 дикого типа, можно удалить ферментативно, например, посредством дегликозилирования. Подходящие гликолитические ферменты включают без ограничения пептид-N-гликозидазу (ПНГазу).

Термин “димерный химерный белок IL-22 Fc” относится к димеру, в котором каждый мономер включает химерный белок IL-22 Fc. Термин “мономерный химерный белок IL-22 Fc” относится к димеру, в котором один мономер включает химерный белок IL-22 Fc (плечо IL-22 Fc), в то время как другой мономер включает Fc участок без полипептида IL-22 (плечо Fc). Соответственно, димерный химерный белок IL-22 Fc является бивалентным относительно связывания IL-22R, в то время как мономерный химерный белок IL-22 Fc является моновалентным относительно связывания IL-22R. Гетеродимеризацию мономерного химерного белка IL-22 Fc может облегчить посредством способов, известных из уровня техники, включая без ограничения гетеродимеризацию посредством методики выступ-во-впадину (knob-into-hole). Способ построения и сборки по методике выступ-во-впадине можно обнаружить, например, в патентных документах US5821333, US7642228, US 2011/0287009 и PCT/US2012/059810, включенных, таким образом, при помощи ссылки в полном их объеме. Такую методику разработали путем внесения “выступа” (или выпячивание) посредством замены небольшого аминокислотного остатка на большой остаток в

домене CH3 одного Fc и внесения “впадины” (или углубления) в домен CH3 другого Fc посредством замены одного или нескольких больших аминокислотных остатков на меньшие. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерное плечо IL-22 Fc содержит выступ, и одно плечо Fc содержит впадину.

Предпочтительные остатки для формирования выступа обычно представляют собой встречающиеся в природе аминокислотные остатки и предпочтительно выбраны из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W). Наиболее предпочтительными являются триптофан и тирозин. В соответствии с одним вариантом осуществления исходный остаток для формирования выступа имеет небольшое величину боковой цепи, например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глицин, серин, треонин или валин. Иллюстративные аминокислотные замены в домене CH3 для формирования выступа включают без ограничения замену T366W, T366Y или F405W.

Предпочтительные остатки для формирования впадины обычно представляют собой встречающиеся в природе аминокислотные остатки и предпочтительно выбраны из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V). В соответствии с одним вариантом осуществления исходный остаток для формирования впадины имеет большую величину боковой цепи, например, тирозин, аргинин, фенилаланин или триптофан. Иллюстративные аминокислотные замены в домене CH3 для создания впадины включают без ограничения замены T366S, L368A, F405A, Y407A, Y407T и Y407V. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выступ содержит замену T366W, а впадина содержит замены T366S/L368A/Y407V. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления Fc участок мономерного химерного белка IL-22 Fc содержит Fc участок IgG1. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления мономерный гибрид IL-22 IgG1 Fc содержит плечо с выступом IL-22 Fc и плечо со впадиной Fc. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления плечо с выступом IL-22 Fc содержит замену T366W (SEQ ID NO:61), а плечо со впадиной Fc содержит T366S, L368A и Y407V (SEQ ID NO:62). В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления Fc участок обоих плечей дополнительно содержит мутацию N297G или N297A. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления мономерный химерный белок IL-22 Fc экспрессируется в клетках *E. coli*. Понятно, что настоящей заявкой также предполагаются и охватываются другие известные из уровня техники модификации Fc участка, которые облегчают гетеродимеризацию.

Термин “рана” относится к повреждению, особенно к такому, при котором кожа или другая внешняя поверхность является рваной, колотой, резаной или иначе поврежденной.

Термин “язва” относится к месту повреждения на коже или слизистой оболочке, которое зачастую характеризуют образованием гноя, омертвлением ткани и часто сопровождается воспалительной реакцией.

Применяемый в настоящем документе термин “кишечник” или “кишка” в широком смысле охватывает тонкий кишечник и толстый кишечник.

Термин “ускорение заживление ран” или “увеличение скорости заживления ран” относится к повышению скорости заживления, например, уменьшению времени до полного закрытия раны или уменьшению времени до достижения % уменьшения площади раны.

“Диабетическая рана” представляет собой рану, которая ассоциирована с сахарным диабетом.

“Диабетическая язва” представляет собой язву, которая ассоциирована с сахарным диабетом.

“Хронический рана” относится к ране, которая не заживает. См., например, Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, *Arch. Dermatol.* 130:489-93 (1994). Хронические раны включают без ограничения, например, артериальные язвы, диабетические язвы, пролежневые язвы или пролежни, венозные язвы и т. д. Острая рана может развиться в хроническую рану. Острые раны включают без ограничения раны, вызванные, например, термическим повреждением (например, ожог), травму, хирургический надрез, удаление обширной злокачественной опухоли кожи, глубокие грибные и бактериальные инфекции, васкулит, склеродерму, пемфигус, токсический эпидермальный некролиз и т. д. См., например, Buford, Wound Healing and Pressure Sores, *HealingWell.com*, published on: October 24, 2001. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления хроническая раной представляет собой инфицированную рану. “Нормальная рана” относится к ране, которая подвергается нормальному восстановлению при заживлении раны.

“Акцепторный человеческий каркасный участок” в контексте настоящего изобретения является каркасным участком, содержащим аминокислотную последовательность каркасного участка вариабельного домена легкой цепи (VL) или каркасного участка вариабельного домена тяжелой цепи (VH), полученным от человеческого иммуноглобулинового каркасного участка или человеческого

консенсусного каркасного участка, как определено ниже. Акцепторный человеческий каркасный участок, “полученный от” человеческого иммуноглобулинового каркасного участка или человеческого консенсусного каркасного участка, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или он может содержать изменения аминокислотной последовательности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления число аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления акцепторный человеческий каркасный участок VL является идентичным последовательности человеческого иммуноглобулинового каркасного участка VL или последовательности человеческого консенсусного каркасного участка.

“Аффинность” относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между одним участком связывания у молекулы (например, лиганда или антитела) и его партнером по связыванию (например, рецептором или антигеном). Если не указано иное, применяемый в настоящем документе термин “аффинность связывания” относится к естественной аффинности связывания, которая отражает 1:1 взаимодействие между членами пары связывания (например, химерным белком IL-22 Fc и рецептором IL-22). Аффинность молекулы X по отношению к ее партнеру Y можно в целом представить при помощи константы диссоциации (Kd). Аффинность можно измерить посредством общепринятых в настоящей области способов, включая описанные в настоящем документе. Конкретные наглядные и иллюстративные варианты осуществления для оценки аффинности связывания описаны далее.

Термин "антитело" в настоящем документе применяют в наиболее широком смысле, и он охватывает различные структуры по типу антител, в том числе без ограничения моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител при условии, что у них наблюдают необходимую антигенсвязывающую активность.

"Фрагмент антитела" относится к отличной от интактного антитела молекуле, которая содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают без ограничения Fv, Fab, Fab', Fab’-SH, $F(ab')_2$; диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

“Антитело, которое связывается с тем же эпитопом”, что и эталонное антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание эталонного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и наоборот, эталонное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Иллюстративный конкурентный анализ приведен в настоящем документе.

Термин "химерное" антитело относится к антителу, у которого часть тяжелой и/или легкой цепи происходит от конкретного источника или вида, в то время, как другая тяжелая и/или легкая цепь происходит от другого источника или вида.

“Класс” антитела относится к типу константного домена или константного участка, содержащемуся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно подразделить на подклассы (изотипы), например, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 и IgA_2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулина, называют α, δ, ε, γ и μ, соответственно.

Используемый в настоящем документе термин "цитотоксическое средство" относится к веществу, которое ингибирует клеточную функцию или препятствует ей и/или приводит к гибели или разрушению клетки. Цитотоксические средства включают без ограничения радиоактивные изотопы (например, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства или лекарственные средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин C, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие средства), ингибиторы роста, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики, токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, и раскрытые ниже различные противоопухолевые и противораковые средства.

“Эффекторные функции” или “эффекторные активности” относятся к таким биологическим активностям, которые связаны с Fc участком антитела и варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание рецепторов Fc, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, даун-регуляцию рецепторов на клеточной поверхности (например, рецептора B-клеток) и B-клеточную активацию. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления у химерного белка IL-22 Fc не наблюдают какой-либо эффекторной функции или какой-либо определяемой эффекторной функции. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc характеризуется существенно уменьшенной эффекторной функцией, например, приблизительно на 50%, 60%, 70% 80% или 90% уменьшенной эффекторной функцией.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" средства, например, фармацевтического состава, относится к количеству, эффективному при дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения необходимого терапевтического или профилактического результата.

Например, в случае сердечно-сосудистого заболевания или состояния, терапевтически эффективное количество полипептида IL-22, химерного белка или агониста может уменьшить степень формирования атеросклеротических бляшек; уменьшить размер атеросклеротической бляшки(бляшек); ингибировать (т. е. замедлить до определенной степени и предпочтительно остановить) атеросклеротическую бляшку; ингибировать (т. е. замедлить до определенной степени и предпочтительно остановить) тромбоз или разрыв атеросклеротической бляшки; и/или облегчить до некоторой степени один или несколько из симптомов, ассоциированных с таким заболеванием или состоянием.

Под "уменьшить или ингибировать" подразумевают способность вызывать общее понижение предпочтительно на 20% или более, более предпочтительно на 50% или более и наиболее предпочтительно на 75%, 85%, 90%, 95% или более. Уменьшение или ингибирование может относиться к симптомам подвергаемого лечению заболевания, наличию или размеру атеросклеротических бляшек или числу атеросклеротических бляшек.

“Субоптимальное количество” относится к количеству, меньше оптимального количества, терапевтического средства, обычно применяемого для определенного лечения. Если субъекту дают два терапевтических средства, либо одновременно, либо последовательно, то каждое терапевтическое средство можно давать в субоптимальном количестве по сравнению с лечением, когда каждое терапевтическое средство дают по-отдельности. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуждающемуся в лечении IBD субъекту вводят фармацевтическую композицию, содержащую химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению и дексаметазон в субоптимальном количестве.

"Каркасный участок" или "FR" относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельного участка (HVR). FR вариабельного домена обычно состоит из четырех FR доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR обычно представлены в следующей последовательности в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело" используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения антитела со структурой, практически схожей со структурой нативного антитела, или с тяжелыми цепями, которые содержат описываемый в настоящем документе Fc участок.

Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используют взаимозаменяемо, и они обозначают клетки, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформантов" и "трансформированные клетки", которые включают первично трансформированную клетку и полученное от нее потомство без учета числа пересевов. Трансформированная клетка включает временно или стабильно трансформированную клетку. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновых кислот с родительской клеткой, но может содержать мутации. Настоящее изобретение относится к мутантному потомству, которое характеризуется такой же функциональной или биологической активностью, по которой проводят скрининг или отбор у изначально трансформированной клетки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин является временно трансфицированной при помощи экзогенной нуклеиновой кислоты. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления клетка-хозяин является стабильно трансфицированной при помощи экзогенной нуклеиновой кислоты.

“Человеческое антитело” является антителом, которое обладает аминокислотной последовательностью, которая соответствует последовательности антитела, вырабатываемого человеком или человеческой клеткой или полученной от источника, отличного от человека, который использует репертуар человеческих антител или другие кодирующие человеческое антитело последовательности. Такое определение человеческого антитела, в частности, исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки, отличные от человеческих.

“Человеческий консенсусный каркасный участок” является каркасным участком, который демонстрирует наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при отборе человеческих иммуноглобулиновых каркасных последовательностей VL или

VH. Как правило, отбор человеческих иммуноглобулиновых последовательностей VL или VH происходит из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей является подгруппой согласно Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В соответствии с одним вариантом осуществления для VL подгруппой является подгруппа каппа I согласно Kabat et al., *ранее.* В соответствии с одним вариантом осуществления для VH подгруппой является подгруппа III согласно Kabat et al., *ранее.*

"Гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из отличных от человеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного, и, как правило, двух, вариабельных доменов, в которых все или практически все из HVR (например, CDR) соответствуют таковым из отличного от человеческого антитела, все или практически все из FR соответствуют таковым из человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константного участка антитела, полученную из человеческого антитела. "Гуманизированная форма" антитела, например, отличного от человеческого антитела, относится к антителу, которое было подвергнуто гуманизации.

Применяемый в настоящем документе термин "гипервариабельный участок" или "HVR" относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности ("определяющие комплементарность участки" или "CDR"), и/или формируют структурно определяемые петли ("гипервариабельные петли"), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки ("антигенные контакты"). Обычно антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Иллюстративные HVR в настоящем документе включают:

(a) гипервариабельные петли, встречающиеся в аминокислотных остатках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR, встречающиеся в аминокислотных остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) антигенные контакты, встречающиеся в аминокислотных остатках 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); и

(d) комбинации (a), (b) и/или (c), включающие аминокислотные остатки 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) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки FR) пронумерованы в настоящем документе в соответствии с Kabat et al., *ранее*.

“Иммуноконъюгат” представляет собой антитело или фрагмент антитела, конъюгированные с одной или несколькими гетерологичными молекулами, включая без ограничения цитотоксическое средство.

“Индивидуум”, “субъект” или “больной” является млекопитающим. Млекопитающие включают без ограничения одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и остальных приматов, таких как макаки), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления индивидуумом, субъектом или больным является человек.

“Выделенный” химерный белок IL-22 является белком, который отделили от среды клетки-хозяина, который рекомбинантно вырабатывает химерный белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 очищен до степени чистоты, превышающей 95% или 99%, с помощью, например, электрофореза (например, SDS-PAGE, изоэлектрического фокусирования (IEF), капиллярного электрофореза) или хроматографии (например, ионообменной или обращенно-фазовой HPLC).

"Выделенная" нуклеиновая кислота обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонента его естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в местоположении на хромосоме, которое отличается от его естественного местоположения на хромосоме.

“Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая химерный белок IL-22 Fc”, относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок IL-22 Fc, в том числе к такой молекуле(молекулам) нуклеиновой

кислоты в одном векторе или раздельных векторах, такой молекуле(молекулам) нуклеиновой кислоты, которая временно или стабильно трансфицирована в клетку-хозяина, и такой молекуле(молекулам) нуклеиновой кислоты, которые присутствует в одном или нескольких положениях в клетке-хозяине.

Термин "управляющие последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Управляющие последовательности, которые подходят для прокариотов, например, включают промотор, необязательно операторную последовательность и участок связывания рибосом. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", когда она расположена в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК для последовательности-предшественника или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК для полипептида, если она экспрессируется как белок-предшественник, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательность, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы способствовать трансляции. Как правило, "функционально связанный" означает, что последовательности ДНК, подвергаемые соединению, являются смежными, и, в случае секреторной лидерной последовательности, смежными и в рамке считывания. Тем не менее, энхансеры не должны быть смежными. Соединение завершается лигированием в традиционных участках рестрикции. Если таких участков нет, то используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с традиционной практикой.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, получаемому из совокупности практически однородных антител, т. е. формирующие популяцию отдельные антитела являются идентичными и/или связываются с одним эпитопом, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих природные мутации или образовавшихся в ходе получения препарата моноклональных антител, причем такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител,

которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело из препарата моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, определение "моноклональное" указывает на признак антитела как получаемого из практически однородной совокупности антител, и его не следует рассматривать как нуждающееся в получении каким-либо конкретным способом антитело. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены с помощью ряда методик, включая без ограничения способ гибридом, способы с использованием рекомбинантной ДНК, способы фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, содержащих все иммуноглобулиновые локусы человека или их часть, причем в настоящем документе описаны такие способы и другие иллюстративные способы получения моноклональных антител.

Термин "голое антитело" относится к антителу, которое не конъюгировано с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксичным фрагментом) или радиоактивной меткой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтическом составе.

Термин "нативные антитела" относится к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулина с различными структурами. Например, нативные IgG-антитела представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, которые связаны дисульфидными мостиками. От N- до C-конца каждая тяжелая цепь имеет вариабельный участок (VH), также называемый вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которым следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогично, от N- до C-конца каждая легкая цепь имеет вариабельный участок (VL), также называемый вариабельным легким доменом или вариабельным доменом легкой цепи, за которым следует константный домен (CL). Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности ее константного домена.

“Нативная последовательность Fc участка” содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc участка, который встречается в природе. Человеческие Fc участки с нативной последовательностью включают без ограничения человеческий Fc участок IgG1 с

нативной последовательностью (отличный от A и A аллотипы); человеческий Fc участок IgG2 с нативной последовательностью; человеческий Fc участок IgG3 с нативной последовательностью; и человеческий Fc участок IgG4 с нативной последовательностью, а также их встречающиеся в природе варианты.

“Вариантный Fc участок” содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности Fc участка с нативной последовательностью за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации, предпочтительно одной аминокислотной замены или нескольких аминокислотных замен. Предпочтительно, вариантный Fc участок имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc участком с нативной последовательностью или Fc участком исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в Fc участке с нативной последовательностью или в Fc участке исходного полипептида. Вариантный Fc участок в настоящем документе будет предпочтительно обладать по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc участком с нативной последовательностью и/или с Fc участком исходного полипептида и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% гомологией с ними, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологией с ними. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариантная Fc участок не является гликозилированным.

Термин “воспалительное расстройство кишечника”, “воспалительное заболевание кишечника” или IBD применяют в настоящем документе в наиболее широком смысле, и он включает все заболевания и патологические состояния, патогенез которых включает рецидивирующее воспаление в кишечнике, включая тонкий кишечник и толстую кишку. Обычно наблюдаемое IBD включает язвенный колит и болезнь Крона. IBD не ограничено UC и CD. Проявления заболевания включают без ограничения воспаление и понижение целостности эпителия в кишечнике.

Термин "сердечно-сосудистое заболевание" или “сердечно-сосудистое нарушение” применяют в настоящем документе в наиболее широком смысле, и он включает все заболевания и патологические состояния, патогенез которых включает патологии кровеносных сосудов, такие как, например, формирование атеросклеротических бляшек (включая стабильные или нестабильные/атероматозные бляшки), атеросклероз, артериосклероз, артериолосклероз и воздействие повышенных липополисахаридов (LPS) в системном кровотоке. Термин дополнительно включает

заболевания и патологические состояния, на которые положительно влияет ингибирование формирования атеросклеротических бляшек. Сердечно-сосудистые заболевания включают без ограничения атеросклероз коронарной артерии, коронарное микрососудистое заболевание, инсульт, заболевание сонной артерии, заболевание периферических артерий, ишемию, болезнь коронарных артерий (CAD), острый коронарный синдром (ACS), коронарное заболевание сердца (CHD), состояния, ассоциированные с CAD и CHD, нарушение мозгового кровообращения, заболевание периферических сосудов, аневризм, васкулит, венозный тромбоз, сахарный диабет и метаболический синдром, хроническое заболевание почек, глубокое повреждение ткани после ишемии и реперфузии, сердечно-легочное шунтирование. В частности, в эту группу включают все ассоциированные сердечно-сосудистые заболевания, частоту, развитие или прогрессирование которых можно контролировать посредством ингибирования формирования атеросклеротических бляшек.

Термин "сердечно-сосудистое состояние" применяют в настоящем документе в наиболее широком смысле, и он включает все сердечно-сосудистые состояния и заболевания, патологию которых включает формирование атеросклеротических бляшек (включая стабильные или нестабильные/атероматозные бляшки), атеросклероз, артериосклероз, артериолосклероз и воздействие повышенных липополисахаридов (LPS) в системном кровотоке. В частности, в эту группу включают все сердечно-сосудистые состояния и заболевания, ассоциированные с образованием атеросклеротических бляшек, частоту, развитие или прогрессирование которых можно контролировать посредством ингибирования формирования атеросклеротических бляшек. Термин, в частности, включает заболевания и патологические состояния, на которые положительно влияет ингибирование формирования атеросклеротических бляшек. Сердечно-сосудистые состояния включают без ограничения атеросклероз коронарной артерии, коронарное микрососудистое заболевание, инсульт, заболевание сонной артерии, заболевание периферических артерий, ишемию, болезнь коронарных артерий (CAD), коронарное заболевание сердца (CHD), состояния, ассоциированные с CAD и CHD, нарушение мозгового кровообращения и состояния, ассоциированные с нарушением мозгового кровообращения, заболевание периферических сосудов, аневризм, васкулит, венозный тромбоз, сахарный диабет и метаболический синдром, хроническое заболевание почек, глубокое повреждение ткани после ишемии и реперфузии и сердечно-легочное шунтирование. Применяемое в настоящем документе выражение "состояния, ассоциированные с нарушением мозгового кровообращения",

включает, например, транзиторную ишемическую атаку (TIA) и инсульт. Применяемое в настоящем документе выражение "состояния, ассоциированные с заболеванием периферических сосудов", включает, например, хромоту. В частности, в эту группу включают все ассоциированные сердечно-сосудистые заболевания и состояния, частоту, развитие или прогрессирование которых можно контролировать посредством ингибирования формирования атеросклеротических бляшек.

Формирование атеросклеротических бляшек может происходить в результате естественной иммунной реакции на метаболический эндотоксикоз, который характеризуется повышенными уровнями липополисахаридов (LPS) в системном кровотоке, которые берут начало от кишечной микробиоты, и потерей функциональной целостности барьера слизистой оболочки кишки. Врожденная иммунная реакция на эндотоксикоз приводит в результате к слабо выраженному хроническому воспалению, которое приводит к формированию бляшек.

Термин “метаболический синдром” применяют в настоящем документе в наиболее широком смысле. Метаболический синдром включает совместное проявление у взрослого субъекта нескольких метаболических факторов риска, включая по меньшей мере три из следующих пяти признаков: центральное ожирение, которое может, например, быть в окружности талии, превышающее или равное 90 см у мужчин и превышающее или равное 80 см у женщин; повышенный уровень триглицеридов в сыворотке крови, который может, например, превышать или быть равным 150 мг/дл, или лечение лекарственным средством от повышенных триглицеридов; уменьшенный уровень HDL холестерина в сыворотке крови, который может, например, быть ниже 40 мг/дл у мужчин и ниже 50 мг/дл у женщин, или лечение лекарственным средством для понижения HDL холестерина; гипертония, которая может, например, представлять собой систолическое давление крови, превышающее 130 мм рт.ст., и диастолическое давление крови, превышающее 85 мм рт.ст., или лечение лекарственным средством от гипертонии; и повышенный уровень глюкозы натощак в плазме, который может, например, превышать или быть равным 100 мг/дл, лечение лекарственным средством от повышенного уровня глюкозы, или ранее диагностированный сахарный диабет 2 типа. См. также Meigs, the Metabolic Syndrome (Insulin Resistance Syndrome or Syndrome X), http://www.uptodate.com/contents/the-metabolic-syndrome-insulin-resistance-syndrome-or-syndrome-x раскрытие которого включено, таким образом, при помощи ссылки.

Для детей старше 16 лет можно применять приведенные выше критерии для взрослых. Для детей возрастом 10-16 лет метаболический синдром включает

совместное проявление у субъекта нескольких метаболических факторов риска, включая по меньшей мере три из следующих пяти признаков: центральное ожирение, которое может, например, быть в окружности более 90-ой процентили; повышенный уровень триглицеридов в сыворотке, который может, например, превышать или быть равным 110 мг/дл, более 95-ой процентили, или лечение лекарственным средством от повышенных триглицеридов; уменьшенный уровень HDL холестерина в сыворотке, который может, например, быть ниже 40 мг/дл, менее 5-ой процентили, или лечение лекарственным средством для понижения HDL холестерина; гипертония, которая может, например, представлять собой систолическое давление крови, превышающее 130 мм рт.ст. и диастолическое давление крови, превышающее 85 мм рт.ст., более 90-ой процентили, или лечение лекарственным средством от гипертонии; и повышенный уровень глюкозы натощак в плазме крови, который может, например, превышать или быть равным 100 мг/дл, нарушение толерантности к глюкозе, лечение лекарственным средством от повышенного уровня глюкозы или ранее диагностированный сахарный диабет 2 типа.

По большому счету, факторы риска, которые совместно проявляются при метаболическом синдроме, включают ожирение (такое как центральное ожирение), гипергликемию, дислипидемию, резистентность к инсулину и/или гипертонию. Все эти факторы риска стимулируют развитие атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания, сахарного диабета или как первого, так и второго. Метаболический синдром также может быть характерным признаком хронического воспаления жировой ткани.

Метаболический синдром можно распознать как провоспалительное, претромботическое состояние, и он может быть ассоциирован с повышенными уровнями одного или нескольких из С-реактивного белка, IL-6, LPS и ингибитора активатора плазминогена 1; такие маркеры могут быть ассоциированы с повышенным риском последующего развития атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания, сахарного диабета или как первого, так и второго.

Метаболический синдром может быть ассоциирован с несколькими связанными с ожирением заболеваниями, включая одно или несколько из заболевания жировой дистрофией с жировым гепатозом, фиброзом и циррозом, печеночно-клеточной и внутрипеченочной холангиокарциномы, хронического заболевания почек, синдрома поликистоза яичников, нарушения дыхания во сне, включая синдром обструктивного апноэ сна, и гиперурикемии и подагры.

Термин “связанное с инсулином нарушение” охватывает заболевания или состояния, характеризуемые нарушением толерантности к глюкозе. В соответствии с одним вариантом осуществления связанное с инсулином нарушение представляет собой сахарный диабет, включая без ограничения сахарный диабет I типа (инсулин-зависимый сахарный диабет или IDDM), II типа (инсулин-независимый сахарный диабет или NIDDM), гестационный диабет и любое другое нарушение, которое можно облегчить средствами, которые стимулируют секрецию инсулина. В соответствии с другим вариантом осуществления связанное с инсулином нарушение характеризуется резистентностью к инсулину.

Термин “сепсис” применяют в его наиболее широком смысле, и он может охватывать состояние системного воспаления, спровоцированное тяжелой инфекцией. Сепсис может вызывать реакцию иммунной системы на серьезную инфекцию, чаще всего бактериальную, но также вызванную грибами, вирусами и паразитами в крови, мочевыводящих путях, легких, коже или других тканях.

Термин “острый эндотоксикоз” применяют в его наиболее широком смысле, и он может охватывать состояние повышенного уровня бактериального липополисахарида (LPS) в плазме крови. В свою очередь, острый эндотоксикоз может привести к сепсису. Повышенный LPS в большом круге кровообращения будет индуцировать хроническое слабое воспаление, активируя эндогенную защитную реакцию организма с повышением уровня липидов в плазме крови, которое при хроническом состоянии способствует развитию индуцированного рационом ожирения, резистентности к инсулину и атеросклерозу и последующим случаям CVD.

Применяемый в настоящем описании термин “лечение” (и его грамматические варианты, такие как “лечить” или “проведение лечения”) относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение болезни у подвергаемого лечению индивидуума, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в ходе протекания клинической патологии. Необходимые эффекты лечения включают без ограничения предупреждение проявления или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предупреждение метастаза, понижение скорости прогрессирования заболевания, ослабление или облегчения болезненного состояния и ремиссию или улучшенный прогноз.

Например, по отношению к IBD, “лечение” может относиться к понижению вероятности развития IBD, понижению скорости развития IBD и понижению тяжести

заболевания. В качестве другого примера, касательно формирования атеросклеротических бляшек, "лечение" может относится к понижению вероятности развития отложений атеросклеротических бляшек, понижению скорости развития отложений, понижение количества или размеров существующих отложений или улучшить стабильность бляшек. Нуждающиеся в лечении включают субъектов, уже имеющих заболевания, а также субъектов у которых необходимо предупредить заболевание. Необходимые эффекты лечения включают без ограничения предупреждение проявления или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предупреждение заболевания, понижение скорости прогрессирования заболевания, ослабление, или облегчения, или ослабление течения заболевания и вызов ремиссии или улучшенный прогноз. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению применяют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "нуждающийся в этом субъект" в контексте предупреждения или лечения сердечно-сосудистого состояния относится к субъекту, у которого диагностировали сердечно-сосудистое заболевание, или сердечно-сосудистое состояние (CVD), или метаболический синдром, или у которого наблюдают одно или несколько состояний, ассоциированных с CVD или метаболическим синдромом, к субъекту, у которого диагностировали или наблюдали одно или несколько состояний, ассоциированных с CVD или метаболическим синдромом, в прошлом, или к субъекту, который считается подверженным риску развития CVD, или метаболического синдрома, или одного или нескольких состояний, ассоциированным с CVD или метаболическим синдромом, в будущем в связи с наследственностью или факторами окружающей среды. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуждающийся в этом субъект может быть субъектом, у которого наблюдают CVD, или метаболический синдром, или состояние, ассоциированное с CVD или метаболическим синдромом, или субъектом, у которого наблюдали CVD, или метаболический синдром или состояние, ассоциированное с CVD или метаболическим синдромом, в прошлом, или считается подверженным риску развития CVD, или метаболического синдрома, или состояния ассоциированного с CVD или метаболическим синдромом, в будущем.

При лечении сердечно-сосудистого заболевания или состояния терапевтическое средство непосредственно изменять степень реакции компонента иммунной реакции или сделать заболевание более чувствительным к лечению другими терапевтическими средствами, например, антибиотиками, противогрибковыми средствами, противовоспалительными средствами, химиотерапевтическими средствами и т. д. При лечении артериального заболевания лечение может, например, предупреждать или замедлять прогрессирование заболевания. Таким образом, лечение артериального заболевания, в частности, включает предупреждение, ингибирование или замедление развития состояния или прогрессирования от одной стадии состояния до другой более поздней стадии или в более тяжелое, связанное состояние.

"Патология" заболевания или состояния включает все явления, которые подвергают опасности здоровье субъекта. В случае сердечно-сосудистого заболевания или состояния она включает без ограничения формирование атеросклеротических бляшек (включая стабильные/нестабильные/чувствительные бляшки), атеросклероз, артериосклероз, артериолосклероз и воздействие повышенных липополисахаридов (LPS) в системном кровотоке (LPS).

"Облегчение", “смягчение” или их эквиваленты относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим, и к превентивным мерам, при которых объект должен облегчить, предупредить, замедлить (уменьшить), понизить или ингибировать заболевание или состояние, например, образование атеросклеротических бляшек. Нуждающиеся в лечении включают субъектов, уже имеющих заболевание или состояние, а также субъектов, склонных к заболеванию или состоянию, или субъектов, у которых необходимо предупредить заболевание или состояние.

"Постоянное" введение относится к введению средства(средств) в непрерывном режиме, в противоположность кратковременному режиму, так, чтобы поддерживать изначальный терапевтический эффект на протяжении длительного периода времени.

“Периодическое” введение является лечением, которое осуществляют не последовательно без перерыва, а скорее циклическим способом.

Термин “листовка-вкладыш в упаковке” используют для обозначения инструкций, традиционно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях касательно применения таких терапевтических продуктов.

“Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно эталонной полипептидной последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения гэпов, в случае необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и не учитывая любые консервативные замены как часть идентичности последовательности. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотной последовательности можно осуществить различными способами, которые относятся к компетенции специалиста в настоящей области, например, при помощи общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалист в настоящей области сможет определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для осуществления максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. В контексте настоящего документа, тем не менее, значения % идентичности аминокислотной последовательности получают при помощи компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc., и исходный код был подан с документацией для пользователя в Ведомство по охране авторского права США, Washington D.C., 20559, при этом он зарегистрирован в Ведомстве по охране авторского права США под регистрационным № TXU510087. Программа ALIGN-2 является общедоступной от Genentech, Inc., Южный Сан Франциско, Калифорния, или может быть скомпилирована из исходного кода. Программа ALIGN-2 может быть скомпилирована для применения на операционной системе UNIX, включая Digital UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей устанавливаются посредством программы ALIGN-2 и не изменяются.

В случаях, когда ALIGN-2 используют для сравнений аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотной последовательности у заданной аминокислотной последовательности A к, с или относительно заданной аминокислотной последовательности B (что альтернативно можно перефразировать как заданная аминокислотная последовательность A, которая имеет или характеризуется определенным % идентичности аминокислотной последовательности к, с или

относительно заданной аминокислотной последовательности B) рассчитывают следующим образом:

100-кратное частное X/Y

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения программой для выравнивания последовательностей ALIGN-2, при таком выравнивании A и B с помощью программы, и где Y представляет собой суммарное число аминокислотных остатков в B. Следует понимать, что если длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, то % идентичности аминокислотной последовательности A к B не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности B к A. Если специально не указано иное, все значения % идентичности аминокислотной последовательности, используемые в настоящем документе, получены как описано в предыдущем абзаце при помощи компьютерной программы ALIGN-2.

В качестве дополнительных примеров расчетов % идентичности аминокислотной последовательности при помощи такого способа, ниже продемонстрировано как рассчитать % идентичности аминокислотной последовательности у аминокислотной последовательности, обозначенной "белок сравнения" или “эталонный белок”, с аминокислотной последовательностью, обозначенной "IL-22", причем "IL-22" представляет собой аминокислотную последовательность представляющего интерес полипептида IL-22, "белок для сравнения" представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, относительно которого сравнивают представляющий интерес полипептид "IL-22", а "X, "Y" и "Z" представляют собой различные аминокислотные остатки.

В качестве примеров расчетов % идентичности аминокислотной последовательности при помощи такого способа, в таблицах 1 и 2 продемонстрировано как рассчитать % идентичности аминокислотной последовательности у аминокислотной последовательности, обозначенной "белок сравнения", с аминокислотной последовательностью, обозначенной "IL-22", причем "IL-22" представляет собой аминокислотную последовательность представляющего интерес полипептида IL-22, "белок сравнения" представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, относительно которого сравнивают представляющий интерес полипептид "IL-22", и "X, "Y" и "Z" представляют собой различные аминокислотные остатки.

IL-22 XXXXXXXXXXXXXXX (Длина = 15 аминокислот)

Эталонный белок XXXXXYYYYYYY (Длина = 12 аминокислот)

% аминокислотной идентичности =

(количество идентично совпадающий аминокислотных остатков между двумя полипептидными последовательностями)

Деленное на (общее количество аминокислотных остатков полипептида IL-22)=

5 деленное на 15 = 33,3%

IL-22 XXXXXXXXXX (Длина = 10 аминокислот)

Эталонный белок XXXXXYYYYYYZZYZ (Длина = 15 аминокислот)

% аминокислотной идентичности =

(количество идентично совпадающий аминокислотных остатков между двумя полипептидными последовательностями)

Деленное на (общее количество аминокислотных остатков полипептида IL-22)=

5 деленное на 10 = 50,0%

"Жесткость" реакций гибридизации сможет легко определить рядовой специалист в настоящей области, и, как правило, она является результатом эмпирического расчета в зависимости от длины зонда, температуры промывания и концентрации соли. В большинстве случаев, более длинные зонды нуждаются в более высоких температурах для правильной гибридизации, в то время как более короткие зонды нуждаются в более низких температурах. Гибридизация, как правило, зависит от способности денатурированной ДНК обратно гибридизироваться, если в окружающей среде с температурой, которая ниже их температуры плавления, присутствуют комплементарные нити. Чем выше степень необходимой гомологии между зондом и гибридизируемой последовательностью, тем выше относительная температура, которую можно использовать. В результате из этого следует, что более высокие относительные температуры, как правило, будут делать реакционные условия более жесткими, в то время как более низкие температуры будут делать их менее жесткими. Для дополнительных подробностей и объяснения жесткости реакций гибридизации, см. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Жесткие условия" или "условия высокой жесткости", которые определены в настоящем документе, можно установить при помощи следующих: (1) использовать

низкую ионную силу и высокую температуру для промывания, например, 0,015 М натрия хлорида/0,0015 М натрия цитрата/0,1% натрия додецилсульфата при 5°С; (2) использовать на протяжении гибридизации денатурирующее средство, такое как формамид, например, 50% (объем/объем) формамида с 0,1% бычьего сывороточного альбумина/0,1% фиколла/0,1% поливинилпирролидона/50 мМ натрий-фосфатного буфера при pH 6,5 с 750 мМ натрия хлорида, 75 мМ натрия цитрата при 42°С; или (3) гибридизировать на протяжении ночи в растворе, в котором использованы 50% формамида, 5 x SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М натрия цитрата), 50 мМ фосфата натрия (pH 6,8), 0,1% натрия пирофосфата, 5 x раствор Денхардта, подвергнутая ультразвуковой обработке ДНК из молок лососевых (50 мкг/мл), 0,1% SDS и 10% сульфата декстрана при 42°С, с 10 минутным промыванием при 42°С в 0,2 x SSC (натрия хлорида/натрия цитрата), с последующим 10-минутным промыванием в условиях высокой жесткости, заключающихся в 0,1 x SSC, содержащем EDTA, при 55°С.

"Умеренно жесткие состояния" можно установить как описано у Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, и включают применение промывающего раствора и условия гибридизации (например, температуру, ионную силу и %SDS), менее жесткие, чем описанные выше. Примером умеренно жестких условий является культивирование на протяжении ночи при 37°С в растворе, содержащем: 20% формамида, 5 x SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ тринатрия цитрата), 50 мМ натрия фосфата (pH 7,6), 5 x раствор Денхардта, 10% сульфата декстрана и 20 мг/мл денатурированной дегидратированной в результате гидродинамического сдвига ДНК из молок лососевых, с последующим промыванием фильтров в 1 x SSC при приблизительно 37-50°С. Специалист в настоящей области поймет как скорректировать температуру, ионную силу и т. д., в случае необходимости, чтобы привести в соответствие с такими факторами, как длина зонда и т. п.

Термин "агонист" применяют в наиболее широком смысле, и он включает любую молекулу, которая частично или полностью имитирует биологическую активность полипептида IL-22. Также “агонистом” охватываются молекулы, которые стимулируют транскрипцию или трансляцию иРНК, кодирующей полипептид.

Подходящие молекулы агониста включают, например, агонистические антитела или фрагменты антител; нативный полипептид; фрагменты или варианты аминокислотной последовательности нативного полипептида; пептиды; антисмысловые олигонуклеотиды; малые органические молекулы; и нуклеиновые кислоты, которые кодируют полипептиды, агонисты или антитела. Указание агониста в

форме единственного числа охватывает один агонист или комбинацию из двух или более разных агонистов.

Термин “агонист IL-22" применяют в наиболее широком смысле, и он включает любую молекулу, которая имитирует качественную биологическую активность (определение которой дано в настоящем документе выше) полипептида IL-22 с нативной последовательностью. Агонисты IL-22, в частности, включают полипептиды IL-22-Fc или IL-22 Ig (иммуноадгезины), а также малые молекулы, имитирующие по меньшей мере одну биологическую активность IL-22. Предпочтительно, биологическая активность заключается в связывании рецептора IL-22, взаимодействии с IL-22BP, облегчении прохождению естественной иммунной реакции или, в случае сердечно-сосудистого заболевания или состояния, во влиянии на формирование атеросклеротических бляшек, в частности, в ингибировании формирования атеросклеротических бляшек. Ингибирование формирования бляшек можно оценить любым подходящим способом визуализации, известным специалисту в настоящей области.

IL-22R1 образует пары с другими белками с формированием гетеродимеров в качестве рецепторов для некоторых представителей семейства IL-10. См. Quyang *et al.*, 2011, *ранее*. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления агонисты IL-22 могут включать агонист рецептора IL-22, в том числе цитокин (или химерный белок или его агонист), который связывается и запускает проведение сигнала от IL-22 R1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления агонисты IL-22 включают агонист IL-22R1, в том числе без ограничения агонистическое антитело к IL-22R1; агонист IL-20, в том числе без ограничения полипептид IL-20 или химерный белок IL-20 Fc; и агонист IL-24, в том числе без ограничения полипептид IL-24 или химерный белок IL-24. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления агонисты IL-22R1 включают агонист IL-19, в том числе без ограничения полипептид IL-19 или химерный белок IL-19 Fc; и агонист IL-26, в том числе без ограничения полипептид IL-26 или химерный белок IL-26 Fc. Иллюстративные последовательности для IL-19 (номер доступа GenBank AAG16755.1, SEQ ID NO:77), IL-20 (номер доступа GenBank AAH69311.1, SEQ ID NO:78), IL-24 (номер доступа GenBank AAH09681.1, SEQ ID NO:79) и IL-26 (номер доступа GenBank NP_060872.1, SEQ ID NO:80) приведены в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-19 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77 или зрелый белок без сигнального пептида. В

соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления полипептид IL-20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78 или зрелый белок без сигнального пептида. В соответствии с еще одними вариантами осуществления полипептид IL-24 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79 или зрелый белок без сигнального пептида. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления полипептид IL-26 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80 или зрелый белок без сигнального пептида.

"Малую молекулу" определяют в настоящем документе как имеющую молекулярную массу ниже приблизительно 600, предпочтительно ниже приблизительно 1000 дальтон.

В контексте настоящего изобретения “агонистическое антитело” является антителом, которое частично или полностью имитирует биологическую активность полипептида IL-22.

Термин "фармацевтический состав" или "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который имеет такую форму, которая обеспечивает эффективную биологическую активность описанного в настоящем документе активного ингредиента и которая не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введен состав.

“Фармацевтически приемлемый носитель” относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает без ограничения буфер, вспомогательное средство, разбавитель, стабилизирующее средство или консервант.

Термин "вариабельный участок" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) нативного антитела обычно имеют подобные структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR). (См., например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, связывающиеся с конкретным антигеном антитела могут быть выделены с помощью домена VH или VL из связывающегося с антигеном антитела для скрининга

библиотеки, соответственно, комплементарных доменов VL или VH. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Используемый в настоящем документе термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем документе называют "векторами экспрессии."

II. Композиции и способы

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится, отчасти, к композиции, содержащей терапевтические средства, которые облегчают ассоциированные с IL-22 заболевания или нарушения посредством повышения активностей или проведения сигнала IL-22. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду IL-22 и химерным белкам IL-22 Fc, которые связываются и активируют рецептор IL-22. Химерные белки IL-22 Fc по настоящему изобретению пригодны, например, для диагностики или лечения ассоциированных с IL-22 заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника, и ускорения заживления ран. Кроме того, настоящее изобретение относится к полипептиду IL-22 и химерным белкам IL-22 Fc для лечения других ассоциированных с IL-22 заболеваний, например, сердечно-сосудистых состояний, метаболического синдрома, и ускорения заживления диабетических ран.

A. Иллюстративный полипептид IL-22

В контексте настоящего изобретения полипептид IL-22 включает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:71 (человеческий IL-22 с эндогенной лидерной последовательностью IL-22) (см. фигуру 31), или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO:71. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22 содержит аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:4 (человеческий IL-22 без лидерной последовательности), или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 95% идентична. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22 содержит аминокислотную

последовательность, содержащую SEQ ID NO:4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22 не содержит химеру Fc.

Получение нативных молекул IL-22, наряду с их последовательностями нуклеиновой кислоты и полипептидными последовательностями, можно осуществить посредством способов, известных рядовым специалистам в настоящей области. Например, полипептиды IL-22 можно получить посредством культивирования клеток, трансформированных или трансфицированных при помощи вектора, содержащего нуклеиновую кислоту IL-22. Конечно, подразумевают, что для получения IL-22 можно использовать альтернативные способы, которые хорошо известны из уровня техники. Например, последовательность IL-22 или ее часть, можно получить путем непосредственного синтеза пептидов с применением твердофазных методик (см., например, работу 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). In vitro синтез белков можно проводить с применением ручных методик или путем автоматизации. Автоматизированный синтез можно осуществить, например, с помощью синтезатора пептидов Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Фостер Сити, Калифорния) согласно инструкциям производителя. Различные части IL-22 можно отдельно синтезировать химическими способами и объединить с помощью химических или ферментативных способов с получением полноразмерного IL-22.

Варианты IL-22 можно получить посредством внесения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК, кодирующую полипептид IL-22 с нативной последовательностью, или посредством синтеза необходимого полипептида IL-22. Специалист в настоящей области поймет, что аминокислотные изменения могут изменить посттрансляционные процессы IL-22, например, изменение числа или положения сайтов гликозилирования или изменение характеристик заякоривания в мембране.

Можно получить варианты описанных в настоящем документе полипептидов IL-22 с нативной последовательностью, например, при помощи любых методик и руководств по консервативным и неконсервативным мутациям, изложенным, например, в патенте США № 5364934. Изменения могут представлять собой замену, делецию или вставку одного или нескольких кодонов, кодирующих нативную последовательность или вариант IL-22, что приводит в результате к изменению его аминокислотной последовательности по сравнению с соответствующей нативной последовательностью или вариантом IL-22. Необязательно вариацию осуществляют

посредством замены по меньшей мере одной аминокислоты другой аминокислотой в одном или нескольких доменах полипептида IL-22 с нативной последовательностью. Руководство к определению того, какой аминокислотный остаток можно вставить, заменить или удалить без отрицательного влияния на необходимую активность, можно найти в результате сравнения последовательности IL-22 с последовательностью из гомологичных известных белковых молекул и минимизации числа изменений в аминокислотной последовательности, выполненных в участках с высокой гомологией. Аминокислотные замены могут быть результатом замены одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую схожие структурные и/или химические свойства, например, замена лейцина на серин, т. е. консервативные аминокислотные замены. Вставки или делеции необязательно могут находится в диапазоне от 1 до 5 аминокислот. Возможные изменения можно определить посредством систематического осуществления вставок, делеций или замен аминокислот в последовательности и проверки полученных в результате вариантов на активность в анализе in vitro, описанном в приведенных ниже примерах.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления представляющие интерес консервативные замены показаны в таблице 1 под заголовком "Предпочтительные замены". Если такие замены приводят в результате к изменению биологической активности, то вносят более значимые изменения, обозначенные иллюстративными заменами в таблице 1 или более детально описанные ниже в отношении аминокислотных классов, и подвергают продукты скринингу.

Изменения можно осуществить при помощи способов, известных из уровня техники, таких как олигонуклеотид-опосредованный (сайт-направленный) мутагенез, аланиновое сканирование и ПЦР-мутагенез. Сайт-направленный мутагенез (Carter et al., 1986, Nucl. Acids Res, 13:4331; Zoller et al., 1987, Nucl. Acids Res., 10:6487), кассетный мутагенез (Wells et al., 1985, Gene, 34:315), мутагенез с рестрикционным отбором (Wells et al., 1986, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415) или другие известные методики можно осуществлять на клонированной ДНК с получение вариантной ДНК IL-22.

Также в настоящем документе приведены фрагменты полипептида IL-22 по настоящему изобретению. Такие фрагменты могут быть укоротить на N-конце или C-конце, или они могут быть лишены внутренних остатков, например, при сравнении с полноразмерным нативным белком. У некоторых фрагментов отсутствуют аминокислотные остатки, которые не являются ключевыми для необходимой биологической активности полипептида IL-22 по настоящему изобретению.

Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления фрагмент полипептида IL-22 является биологически активным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у полноразмерного фрагмента IL-22 отсутствует N-концевая сигнальная пептидная последовательность.

В объем настоящего изобретения включены ковалентные модификации нативной последовательности и вариантных полипептидов IL-22. Один тип ковалентной модификации включает целевые вступление в реакцию аминокислотных остатков IL-22 с органическим дериватизирующим средством, которое может вступать в реакцию с избранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками полипептида IL-22. Дериватизация при помощи бифункциональных средств пригодна, например, для сшивания IL-22 с нерастворимой в воде матрицей-подложкой или поверхностью подложки, например, для применения в способе очистки антител к IL-22. Широко применяемые сшивающие средства включают, например, 1,1-бис(диазо-ацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидные сложные эфиры, например, сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидил-пропионат), бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан, и такие средства, как метил-3-[(p-азидофенил)дитио]пропионимидат.

Другие модификации включают дезамидирование глютаминиловых и аспарагиниловых остатков до соответствующих глютамиловых и аспартиловых остатков, соответственно, гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериловых или треониловых остатков, метилирование альфа-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T. E. Creighton, 1983, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86i), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации полипептидов IL-22, включенных в объем настоящего изобретения, включает изменение нативного паттерна гликозилирования полипептидов. "Изменение нативного паттерна гликозилирования" подразумевают, в контексте настоящего изобретения, как означающее удаление одного или нескольких углеводных фрагментов, встречающихся в нативной последовательности IL-22, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в

нативной последовательности IL-22, и/или изменение соотношения и/или состава остатков сахаров, присоединенных к сайту(сайтам) гликозилирования.

Гликозилирование полипептидов является обычно либо N-сцепленным, либо O-сцепленным. N-сцепленное гликозилирование относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности, аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, причем X является любой аминокислотой за исключением пролина, являются распознающими последовательностями для ферментативного прикрепления углеродного фрагмента к аспарагиновой боковой цепи. O-сцепленное гликозилирование относится к прикреплению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидрокисиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя в O-сцепленное гликозилирование может быть также вовлечен 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин. Добавление сайтов гликозилирования в полипептид IL-22 можно осуществить путем изменения аминокислотной последовательности. Изменение можно выполнить, например, посредством добавления одного или нескольких сериновых или треониновых остатков, или замены на них, в нативной последовательности IL-22 (для сайтов N-сцепленного гликозилирования) или добавления последовательности распознавания для O-сцепленного гликозилирования. Аминокислотную последовательность IL-22 необязательно можно изменить посредством изменений уровня ДНК, в частности, посредством мутирования ДНК, кодирующей полипептид IL-22, по предварительно выбранным основаниям так, чтобы получить кодоны, которые будут транслироваться в необходимые аминокислоты.

Другие способы увеличения числа углеводных фрагментов на полипептиде IL-22 заключаются в химическом или ферментативном связывании гликозидов с полипептидом. Такие способы описаны в настоящей области, например, в WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 года, и в работе Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих на полипептиде IL-22, можно осуществить химически или ферментативно или посредством мутационной замены кодонов, кодирующих аминокислотные остатки, которые служат в качестве целей для гликозилирования. Методики химического дегликозилирования известны в настоящей области и описаны, например, в работе Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) и в работе Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на полипептидах можно осуществить с помощью

ряда эндо- и экзогликозидаз, которые описаны в работе Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Другой тип ковалентной модификации IL-22 включает связывание полипептида IL-22 с одним или множеством небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, например, так, как изложено в патентах США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 или 4179337. Нативную последовательность и вариантный IL-22 также можно модифицировать таким образом, чтобы получить химерную молекулу, представляющую собой IL-22, в том числе фрагменты IL-22, гибридизированные с другим гетерологичным полипептидом или другой гетерологичной аминокислотной последовательностью.

В соответствии с одним вариантом осуществления такая химерная молекула представляет собой химеру IL-22 с полипептидом-меткой, который создает эпитоп, с которым может селективно связываться антитело к метке. Эпитопная метка, как правило, расположена на амино- или карбокси-конце полипептида IL-22. Наличие таких форм с эпитопной меткой полипептида IL-22 можно определить при помощи антитела к полипептиду-метке. Также, размещение эпитопной метки дает возможность легкой очистки полипептида IL-22 при помощи аффинной очистки с применением антитела к метке или другого типа аффинной матрицы, которая связывается с эпитопной меткой. В настоящей области хорошо известны различные полипептиды-метки и соответствующие им антитела. Примеры включают полигистидиновые (поли-his) или поли-гистидин-глициновые (поли-his-gly) метки; полипептид-метка, представляющий собой HA вируса гриппа, и его антитело 12CA5 (Field et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165); c-myc метку и антитела 8F9, 3C7, 6E10, G4 и 9E10 к ней (Evan et al., 1985, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616); и метку, представляющую собой гликопротеин D (gD) вируса простого герпеса, и ее антитело (Paborsky et al., 1990, Protein Engineering, 3(6):547-553). Другие полипептиды-метки включают Flag-пептид (Hopp et al., 1988, BioTechnology, 6:1204-1210); пептид с эпитопом KT3 (Martin et al., 1992, Science, 255:192-194); пептид с бета-тубулиновым эпитопом (Skinner et al., 1991, J. Biol. Chem., 266:15163-15166); и пептидную метку на основе белка гена 10 T7 (Lutz-Freyermuth et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397).

В соответствии с другим вариантом осуществления химерная молекула может представлять собой химеру из полипептида IL-22 или его фрагмента с иммуноглобулином или конкретным участком иммуноглобулина. Что касается

бивалентной формы химерной молекулы, то такая химера может быть образована с Fc участком молекулы IgG. Такие химерные полипептиды являются антитело-подобными молекулами, которые сочетают связывающую специфичность гетерологичного белка ("адгезина") с эффекторными функциями иммуноглобулиновых константных доменов, и часто называются иммуноадгезинами. Структурно иммуноадгезины представляют собой химеру аминокислотной последовательности IL-22 или ее варианта и последовательности иммуноглобулинового константного домена. Адгезиновая часть иммуноадгезиновой молекулы, как правило, представляет собой непрерывную аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере сайт связывания рецептора или лиганда. Последовательность константного домена иммуноглобулина в иммуноадгезине можно получить из любого иммуноглобулина, такого как подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgA (включая IgA1 и IgA2), IgE, IgD или IgM. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc характеризуется модифицированной эффекторной активностью.

Полипептид IL-22, или его фрагмент, можно гибридизировать, например, с последовательностью константного участка иммуноглобулиновой тяжелой цепи с получением химерного белка IL-22-Ig (например, химерного белка IL-22 Fc). Полипептид IL-22 может представлять собой человеческий или мышиный IL-22. Последовательность константного участка иммуноглобулиновой тяжелой цепи может представлять собой человеческую или мышиную последовательность константного участка иммуноглобулиновой тяжелой цепи.

B. <u>Иллюстративный химерный белок IL-22 Fc</u>

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к выделенному химерному белку IL-22. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 связывается с рецептором IL-22 и индуцирует его активность или проведение сигнала от него и/или является агонистом активности IL-22 рецептора.

В соответствии с другим аспектом химерный белок IL-22 Fc содержит полипептид, которым имеет последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4. В соответствии с другим вариантом осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит полипептид, который имеет последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную

последовательности, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но при этом химерный белок IL-22 Fc, содержащий такую последовательность, сохраняет способность связываться с IL-22 рецептором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления суммарно от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 24 или 26. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления замены, вставки или делеции находятся в участках вне IL22 (т. е. в Fc). В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления удален остаток Lys на C-конце Fc. В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления удалены остатки как Gly, так и Lys на C-конце Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к вариантам химерных белков IL-22 Fc, имеющим одну или несколько аминокислотных замен. Консервативные замены показаны в таблице 1 под заголовком "Предпочтительные замены". Более значимые изменения приведены в таблице 1 под заголовком "Иллюстративные замены" и дополнительно описаны ниже в отношении классов боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены могут быть внесены в химерный белок IL-22 Fc, а продукты подвергнуты скринингу в отношении необходимой активности, например, сохраненного/улучшенного связывания рецептора IL-22, пониженной иммуногенности или улучшенного проведения сигнала от рецептора IL-22.

Таблица 1

Исходный остаток	**Иллюстративные замены**	**Предпочтительные замены**
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

Исходный остаток	**Иллюстративные замены**	**Предпочтительные замены**
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; 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; норлейцин	Leu

Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

(1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислые: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены повлекут обмен члена одного из таких классов на члена другого класса.

Пригодный способ идентификации остатков или участков белка, которые могут служить объектом для мутагенеза, называется "сканирующий аланином мутагенез", описываемый в работе Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Этот способ включает выявление и замену остатка или группы целевых остатков (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (например, аланин или полиаланин) для определения того, затрагивается ли взаимодействие белка с его партнером по связыванию. В аминокислотные положения могут быть введены дополнительные

замены, демонстрирующие функциональную чувствительность к изначальным заменам. Альтернативно, или дополнительно, кристаллическую структуру белкового комплекса (например, комплекса цитокин-рецептор) можно использовать для определения точек контакта между белком и его партнером по связыванию. Такие контактирующие остатки и соседние остатки могут быть выбраны или исключены в качестве кандидатов на замену. Варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения того, имеют ли они необходимые свойства.

Вставки в аминокислотных последовательностях включают гибридизации с амино- и/или карбоксильным концом, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или более остатков, а также вставки внутри последовательности из одного или множества аминокислотных остатков.

а) <u>Варианты с гликозилированием</u>

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления приведенный в настоящем документе химерный белок Fc изменяют с целью увеличения или уменьшения степени, до которой гликозилируется химерный белок, особенно Fc часть химерного белка. Добавление или удаление участков гликозилирования у белка можно легко осуществить путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы создать или удалить один или несколько сайтов гликозилирования.

Если химерный белок содержит Fc участок, то может быть изменен присоединенный к нему углевод. Вырабатываемые клетками млекопитающего нативные антитела, как правило, содержат разветвленный, двуантенарный олигосахарид, который обычно присоединен с помощью N-связи к Asn297 домена CH2a в Fc участке. См., например, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стволе" двуантенарной олигосахаридной структуры. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для создания Fc вариантов с определенными улучшенными свойствами в антителе или Fc участке могут быть выполнены модификации олигосахарида.

Можно определить количество фукозы, прикрепленной к домену CH2 Fc участка, путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи в Asn297 по отношению к сумме всех присоединенных к Asn 297 или N297 гликоструктур (например, сложных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы) по результатам

измерения MALDI-TO масс-спектрометрии, как, например, описано в WO 2008/077546. Asn297 относится к аспарагиновому остатку, расположенному приблизительно в 297 положении Fc участка (нумерация остатков Fc участка по EU); тем не менее, Asn297 также может быть расположен приблизительно ± 3 аминокислоты выше или ниже 297 положения, т. е. между положениями 294 и 300, по причине незначительных вариаций последовательностей у антител. Такие варианты антител могут характеризоваться улучшенной ADCC функцией. См., например, патентные публикации США № US 2003/0157108 (Presta, L.), US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к "дефукозилированным" вариантам антител или вариантам антител "с дефицитом по фукозе", включают: 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). Примеры способных продуцировать дефукозилированные антитела клеточных линий включают клетки CHO Lec13, дефектные по фукозилированию белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); патентная заявка № US 2003/0157108, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и нокаутные клеточные линии, такие как клетки CHO с нокаутным геном альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); и WO2003/085107).

Варианты антител дополнительно снабжают разделенными пополам олигосахаридами, например, у которых присоединенный к Fc участку антитела двуантенарный олигосахарид разделен пополам посредством GlcNAc. Такие варианты антитела могут характеризоваться пониженным фукозилированием и/или улучшенной ADCC функцией. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.), патенте США № 6602684 (Umana et al.) и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также настоящее изобретение относится к вариантам антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в присоединенном к Fc участку олигосахариде. Такие варианты антител могут характеризоваться улучшенной CDC функцией. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.), WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.).

b) <u>Варианты Fc участка</u>

В соответствии с определенными вариантами осуществления в Fc участок приведенного в настоящем документе химерного белка Fc могут быть введены одна или несколько аминокислотных модификаций с получением, таким образом, варианта Fc участка. Вариант Fc участка может содержать последовательность Fc участка человека (например, Fc участок IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к варианту Fc, который обладает некоторыми, но не всеми, эффекторными функциями, что делает его желаемым кандидатом для применений, в которых важен период полужизни антитела или химерного белка, содержащего Fc участок, *in vivo,* но определенные эффекторные функции (например, комплемента и ADCC) не являются необходимыми или являются пагубными. Для подтверждения снижения/уменьшения CDC и/или ADCC активностей могут быть проведены анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, анализы связывания с рецептором Fc (FcR) могут быть проведены для того, чтобы убедиться, что антитело или Fc не может связываться с FcγR (следовательно, вероятно не обладает ADCC активностью), но сохраняет способность связываться с FcRn. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопоэтических клетках обобщена в таблице 3 на странице 464 в работе Ravetch and Kinet, Annu. *Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки ADCC активности представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № US 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно, могут быть задействованы способы нерадиоактивных анализов (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности ACTI™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc., Маунтин-Вью, Калифорния) и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Мэдисон, Висконсин)). Пригодные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеары периферической крови (PBMC) и натуральные клетки-киллеры (NK). Альтернативно, или дополнительно, ADCC активность представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, как, например,

раскрыто в работе Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Также могут быть осуществлены анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело или Fc не способно связываться с C1q и, следовательно, не обладает CDC активностью. См., например, результаты ELISA по связыванию с C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Определения связывания FcRn и выведение/период полужизни *in vivo* могут быть осуществлены с помощью известных в настоящей области техники способов (см., например, Petkova, S.B. et al., Int'l. *Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Антитела со сниженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или нескольких остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 в Fc участке (см., например, патент США № 6737056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутантов с заменами по двум или более аминокислотным положениям 265, 269, 270, 297 и 327, в том числе так называемый Fc-мутант "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

Описаны некоторые варианты антител или Fc с повышенным или пониженным связыванием с FcR. (См., например, патент США № 6737056 WO 2004/056312 и работу Shields et al., J. Biol. *Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерный белок IL-22 Fc содержит вариант Fc с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые уменьшают ADCC, например, замену в положении 297 Fc участка для удаления сайта N-гликозилирования, и все еще сохраняет активность связывания FcRn (нумерация остатков по EU).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в Fc участке осуществляют изменения, которые в результате дают пониженное связывание C1q и/или измененную комплементзависимую цитотоксичность (CDC), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и работе Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Антитела с повышенными периодами полужизни и повышенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который ответственен за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Такие антитела содержат Fc

участок с одной или несколькими заменами в ней, которые повышают связывание Fc участка с FcRn. Такие Fc-варианты включают варианты с заменами по одному или нескольким остаткам Fc участка: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замена 434 остатка Fc участка (патент США № 7371826).

Касательно других примеров вариантов Fc участка см. также работу Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988), патент США № 5648260, патент США № 5624821 и WO 94/29351.

c) Сконструированные варианты с цистеиновыми заменами

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления может быть необходимо создание сконструированного химерного белка Fc, у которого один или несколько остатков Fc участке антитела заменены цистеиновыми остатками. В соответствии с определенными вариантами осуществления заменяемые остатки находятся на доступных сайтах Fc. В результате замены таких остатков цистеином реакционно-способные тиоловые группы располагаются, таким образом, в доступных сайтах Fc и могут быть использованы для конъюгации Fc с другими фрагментами, такими как лекарственные фрагменты или лекарственные фрагменты с линкером, с образованием иммуноконъюгата, который описан в настоящем документе далее. Например, на цистеин можно заменить S400 (нумерация по EU) Fc участка тяжелой цепи. См., например, патент США № 7521541.

C. Рекомбинантные способы и композиции

Полипептиды IL-22 можно получить при помощи общепринятых рекомбинантных способов, например, культивированием клеток, трансформированных или трансфицированных вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид IL-22, его фрагмент или вариант или химерный белок, содержащий их же. Также настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим такой вектор. К примеру, клетками-хозяевами могут быть клетки CHO, *E. coli* или дрожжей. Дополнительно, настоящее изобретение относится к способу получения любого из описанных в настоящем документе полипептидов, и способ включает культивирование клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии необходимого полипептида, и выделение необходимого полипептида из культуры клеток.

Клетки-хозяева трансфицируют или трансформируют при помощи описанных в настоящем документе векторов экспрессии или клонирующих векторов для получения полипептида IL-22 и культивируют в традиционной питательной среде, соответствующим образом модифицированной для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности. Специалист в настоящей области может подобрать условия культивирования, такие как среда, температура, pH и т. п., без неоправданной постановки эксперимента. В целом, принципы, протоколы и практические методики максимизации продуктивности культур клеток можно найти в работе Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) и Sambrook et al., *ранее*.

Рядовым специалистам в настоящей области известны способы трансфекции, например, при помощи $CaPO_4$ и электропорации. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию проводят с помощью стандартных методик, подходящих для таких клеток. Кальциевую обработку с использованием хлорида кальция, которая описана в работе Sambrook et al., ранее, или электропорацию обычно применяют для прокариот или других клеток, которые имеют серьезные барьеры в форме клеточных стенок. Инфицирование посредством Agrobacterium tumefaciens применяют для трансформации некоторых растительных клеток, как описано в работе Shaw et al., Gene, 23:315 (1983), и WO 89/05859, опубликованной 29 июня 1989 года. Для клеток млекопитающих без таких клеточных стенок, можно использовать способ осаждения фосфатом кальция согласно Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Общие аспекты трансформаций систем клеток-хозяев млекопитающих были описаны в патенте США № 4399216. Трансформации дрожжей, как правило, осуществляют согласно способу, описанному в работе Van Solingen et al., J. Bact, 130:946 (1977) и Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Тем не менее, также можно применять другие способы введения ДНК в клетки, такие как микроинъекция ядра, электропорация, слияние бактериального протопласта с интактными клетками или с помощью поликатионов, например, полибрена, полиорнитина. Для различных методик трансформации клеток млекопитающих см. работу Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) и Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).

Экспрессированные при помощи рекомбинантных методик полипептиды по настоящему изобретению можно выделить из культуральной среды или из лизатов

клеток-хозяев. Иллюстрацией подходящих процедур очистки являются следующие процедуры: путем фракционирования на колонке для ионообменной хроматографии; осаждение в этаноле; обращенно-фазовая HPLC; хроматография на силикагеле или на катион-обменной смоле, такой как DEAE; хроматофокусирование; SDS-PAGE; фракционирование сульфатом аммония; гель-фильтрация с применением, например, Sephadex G-75; колонки с иммобилизированным на сефарозе белком А для удаления загрязняющих примесей, таких как IgG; и колонки для металл-хелатной хроматографии для связывания форм с меченным эпитопом полипептида по настоящему изобретению. Можно использовать различные способы очистки белка и такие способы известны в настоящей области техники и описаны, например, в работе Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). Выбранный этап(ы) очистки будут зависеть, например, от особенностей применяемого способа получения и конкретного получаемого полипептида.

Для получения полипептида по настоящему изобретению можно использовать альтернативные способы, которые хорошо известны из уровня техники. Например, последовательность, кодирующую полипептид или его часть, можно получить путем непосредственного синтеза пептидов с применением твердофазных методик (см., например, работу Stewart et al., 1969, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, *J.* 1963,*Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154. *In vitro* синтез белков можно проводить с применением ручных методик или путем автоматизации. Автоматизированный синтез можно осуществить, например, с помощью синтезатора пептидов Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Фостер Сити, Калифорния) согласно инструкциям производителя. Различные части полипептида по настоящему изобретению или его части можно отдельно синтезировать химическими способами и объединить с помощью химических или ферментативных способов с получением полноразмерного полипептида или его части.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерным молекулам, содержащим любой из описываемых в настоящем документе полипептидов, гибридизированных с гетерологичным полипептидом или аминокислотной последовательностью. Примеры таких химерных молекул включают без ограничения любой из описанных в настоящем документе полипептидов, гибридизированный с последовательностью-меткой эпитопа или Fc участком иммуноглобулина.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в описываемых в настоящем документе векторах включают прокариотические, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот. Подходящие прокариоты включают без ограничения эубактерий, таких как грам-отрицательные или грам-положительные организмы, например, Enterobacteriaceae такие как E. coli. Общедоступны различные штаммы E. coli, такие как E. coli K12 штамм MM294 (ATCC 31446); E. coli X1776 (ATCC 31537); E. coli штамм W3110 (ATCC 27325) и K5 772 (ATCC 53635).

Помимо прокариот подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих IL-22, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи. Широко используемым низшим эукариотическим микроорганизмом-хозяином является Saccharomyces cerevisiae.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного IL-22 получают от многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки насекомых, такие как Drosophila S2 и Spodoptera Sf9, а также растительные клетки. Примеры пригодных клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO) и COS клетки. Более конкретные примеры включают клетки CV1 почки мартышки, трансформированные SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); клетки эмбриональной почки человека (293 или клетки 293, субклонированные для выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); мышиные клетки Сертоли (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); и клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51). Полагают, что выбор подходящей клетки-хозяина относится к компетенции специалиста в настоящей области.

Нуклеиновая кислота (например, кДНК или геномная ДНК), кодирующая IL-22, может быть вставлена в реплицируемый вектор для клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. Общедоступны различные векторы. Вектор может иметь форму, например, плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага. Соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты можно вставить в вектор при помощи ряда процедур. В целом, ДНК вставляют в соответствующий сайт(ы) рестрикционной эндонуклеазы с помощью известных из уровня техники методик. Компоненты вектора обычно включают без ограничения одно или несколько из сигнальной последовательности, точки начала репликации, один или несколько маркерных генов,

энхансерный элемент, промотор и последовательность окончания транскрипции. При построении подходящих векторов, содержащих один или несколько таких компонентов, используют стандартные методики лигирования, которые известны специалистам в настоящей области.

Полипептиды IL-22 можно получить рекомбинантными способами не только прямо, но также в качестве химерного полипептида с гетерологичным полипептидом, который может представлять собой сигнальную последовательность или другой полипептид со специфическим сайтом расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида, а также химерный белок IL-22 Fc. В целом, сигнальная последовательность может представлять собой компонент вектора или она может быть частью ДНК IL-22, которая вставлена в вектор. Сигнальная последовательность может представлять собой прокариотическую сигнальную последовательность, выбранную, например, из группы из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, 1 pp или термостойкого энтеротоксина II. Для секреции из дрожжей сигнальная последовательность может представлять собой, например, лидерную последовательность инвертазы дрожжей, лидерную последовательность альфа фактора (в том числе лидерные последовательности "--фактора Saccharomyces и Kluyveromyces, последние описаны в патенте США № 5010182) или лидерную последовательность кислой фосфатазы, лидерную последовательность глюкоамилазы C. albicans (EP 362179, опубликован 4 апреля 1990 года) или сигнальную последовательность, описанную в WO 90/13646, опубликованной 15 ноября 1990 года. При экспрессии в клетках млекопитающих для управления секрецией белка можно применять сигнальные последовательности млекопитающих, такие как сигнальные последовательности из секретируемых полипептидов одного и того же или родственных видов, а также лидерные последовательности секреции вирусов.

Как векторы экспрессии, так и клонирующие векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Такие последовательности хорошо известны для ряда бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грам-отрицательных бактерий, точка начала репликации плазмиды 2: подходит для дрожжей, и различные вирусные точки начала репликации (SV40, вируса полиомы, аденовируса, VSV или BPV) пригодны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих.

Векторы экспрессии и клонирующие векторы обычно будут содержать ген для отбора, также называемый селектируемым маркером. Типичные векторы для отбора кодируют белки, которые (a) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) дополняют недостающими у ауксотрофа генами или (c) поставляют важные питательные вещества, которые не доступны из сложной среды, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для Bacilli.

Примером подходящих селектируемых маркеров для клеток млекопитающих является маркер, который позволяет выявлять клетки способные поглощать нуклеиновую кислоту IL-22, такой как DHFR или тимидинкиназа. Подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является линия клеток CHO, дефицитных по активности DHFR, получаемая и размножаемая как описано в работе Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Подходящим геном для отбора для применения в дрожжах является ген trp1, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 [см., например, Stinchcomb et al., Nature, 282:39(1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. Ген trp1 обеспечивает маркер отбора для мутантного штамма дрожжей, которые не могут расти в триптофане, например, ATCC № 44076 или PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Векторы экспрессии и клонирующие векторы обычно содержать промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты IL-22, управляя синтезом иРНК. Хорошо известны промоторы, узнаваемые рядом потенциальных клеток-хозяев. Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают бета-лактамазные и лактозные промоторные системы [см., например, Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], промотор щелочной фосфатазы, триптофановую (trp) промоторную систему [см., например, Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36776] и гибридные промоторы, такие как tac промотор [см., например, deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей IL-22.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения с дрожжевыми хозяевами включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы [см., например, Hitzeman et al., J. Biol. Chem, 255:2073 (1980)] или других гликолитических ферментов [см, например, Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland,

Biochemistry, 17:4900 (1978)], таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкоза-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозафосфатизомераза, фосфоглюкоизомераза и глюкокиназа.

Другими дрожжевыми промоторами, которые представляют собой индуцируемые промоторы, обладающие дополнительным преимуществом транскрипции, контролируемой условиями роста, являются промоторные участки для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома С, кислой фосфатазы, деструктивных ферментов, ассоциированных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для применения при экспрессии у дрожжей дополнительно описаны в EP 73657.

Транскрипция IL-22 с векторов в клетках-хозяева млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур (UK 2211504, опубликованный 5 июля 1989 г), аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, актинового промотора или иммуноглобулинового промотора, и из промоторов генов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Транскрипцию ДНК, кодирующей полипептиды IL-22, высшими эукариотами можно повысить путем вставки в вектор энхансерной последовательности. Энхансеры представляют собой действующие в cis-положении элементы ДНК, обычно длиной приблизительно от 10 до 300 п. о., которые действуют на промотор, повышая его транскрипцию. Многие энхансерные последовательности в настоящее время известны из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α-фетопротеина и инсулина). Тем не менее, как правило, будут применять энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 на конечной стороне точки начала репликации (п. о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы на конечной стороне точки начала репликации и энхансеры аденовирусов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в 5' или 3' положении относительно кодирующей последовательности IL-22, но предпочтительно расположен в 5' положении от промотора.

Векторы экспрессии, применяемые в эукариотических клетках-хозяевах (клетках дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядросодержащих клетках из других многоклеточных организмов), также будут содержать последовательности, необходимые окончания транскрипции и для стабилизации иРНК. Такие последовательности обычно доступны с 5' и, иногда 3', конца нетранслируемых участков эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части иРНК, кодирующей IL-22.

Тем не менее, другие способы, векторы и клетки-хозяева, подходящие для адаптации к синтезу IL-22 в культурах рекомбинантных клеток позвоночных, описаны в работе Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:4046 (1979); EP 117,060; и EP 117058.

Амплификацию и/или экспрессию генов можно измерять непосредственно в образце, например, с помощью традиционного саузерн-блоттинга, нозерн-блоттинга для количественного анализа транскрипции иРНК [см., например, Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], дот-блоттинга (анализа ДНК) или гибридизации in situ с применением соответствующим образом меченного зонда, исходя из приведенных в настоящем документе последовательностей. Альтернативно, можно использовать антитела, которые могут распознавать конкретные дуплексы, включая дуплексы ДНК, дуплексы РНК и гибридные дуплексы ДНК-РНК или дуплексы ДНК-белок. Антитела, в свою очередь, можно пометить и провести анализ, в котором дуплекс связан с поверхностью так, что при образовании дуплекса на поверхности можно детектировать наличие антитела, связавшегося с дуплексом.

Альтернативно экспрессию генов можно измерить с помощью иммунологических способов, таких как иммуногистохимическое окрашивание клеток или срезов тканей и анализ культуры клеток или жидкостей организма, для непосредственной количественной оценки экспрессии продукта гена. Антитела, пригодные для иммуногистохимического окрашивания и/или анализа пробных жидкостей, могут представлять собой либо моноклональные, либо поликлональные и могут быть получены у любого млекопитающего. Традиционно, антитела можно получить к полипептиду IL-22 с нативной последовательностью, или к синтетическому пептиду на основе последовательностей ДНК, которые приведены в настоящем документе, или к экзогенной последовательности, гибридизированной с ДНК IL-22 и кодирующей специфический эпитоп антитела.

Формы IL-22 можно выделить из культуральной среды или из лизатов клеток-хозяев. В случае, если они связаны с мембраной, его можно освободить от мембраны с помощью раствора подходящего детергента (например, Triton-X 100) или с помощью ферментативного отщепления. Клетки, используемые в экспрессии IL-22, можно разрушить различными физическими или химическими средствами, такими как цикл замораживание-оттаивание, обработка ультразвуком, механическое разрушение или с помощью средств, лизирующих клетки.

Может быть необходима очистка IL-22 от рекомбинантных белков или полипептидов клетки. Иллюстрацией подходящих процедур очистки являются следующие процедуры: путем фракционирования на колонке для ионообменной хроматографии; осаждение в этаноле; обращенно-фазовая HPLC; хроматография на силикагеле или на катион-обменной смоле, такой как DEAE; хроматофокусирование; SDS-PAGE; фракционирование сульфатом аммония; гель-фильтрация с применением, например, Sephadex G-75; колонки с иммобилизированным на сефарозе белком А для удаления загрязняющих примесей, таких как IgG; и колонки для металл-хелатной хроматографии для связывания форм с меченным эпитопом полипептида IL-22. Можно использовать различные способы очистки белка и такие способы известны в настоящей области техники и описаны, например, в работе Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). Выбранный этап(ы) очистки будут зависеть, например, от особенностей применяемого способа получения и конкретного получаемого IL-22. Описанные выше общие способы можно также применять для получения химерного белка IL-2 Fc.

Аналогичным образом, химерные белки IL-22 Fc можно получить с помощью рекомбинантных способов и композиций, которые описаны, например, в работе *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) и *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA). В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей химерные белки IL-22 Fc. В соответствии со следующим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к одному или нескольким содержащим такую нуклеиновую кислоту векторам (например, векторам экспрессии). В соответствии со следующим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к содержащей такую нуклеиновую кислоту клетке-хозяину. В соответствии с одним вариантом осуществления клетка-хозяин содержит (например, была ним трансформирована)

вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, составляющую химерный белок IL-22 Fc. В соответствии с некоторым вариантом осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. В соответствии с одним вариантом осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к способу получения химерного белка IL-22 Fc, причем способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую приведенный выше химерный белок IL-22 Fc, в подходящих для экспрессии химерного белка IL-22 Fc условиях и, необязательно, выделение химерного белка IL-22 Fc из клетки-хозяина (или культуральной среды клеток-хозяев).

Для рекомбинантного получения химерного белка IL-22 Fc нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный белок IL-22 Fc, например, описываемый в настоящем документе, выделяют и вставляют в один или несколько векторов для последующего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с помощью традиционных процедур (например, путем применения олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими химерный белок). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления при получении химерных белков IL-22 Fc нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид IL-22 или его фрагмент, можно лигировать с нуклеиновой кислотой, кодирующей последовательность константного домена иммуноглобулина в заданном положении на константном домене, с получением в результате химеры с Fc на C-конце IL-22; тем не менее также возможны N-концевые химеры.

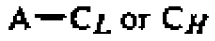
В качестве примера построения химерного белка IL-22 Fc, ДНК, кодирующую IL-22, расщепляют с помощью рестрикционного фермента на 3' конце, или вблизи от него, ДНК, кодирующей IL-22, и в точке на или вблизи ДНК, кодирующей N-конец зрелого полипептида (при этом предусмотрено применение различных лидерных последовательностей) или на кодирующем N-конец участке, или вблизи него, для полноразмерного белка IL-22 (в котором используют нативную сигнальную последовательность). Затем такой фрагмент ДНК легко вставить в ДНК, кодирующую константный участок легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, и, при необходимости, изменить при помощи делеционного мутагенеза. Предпочтительно, это

будет иммуноглобулин человека, если химерный белок предназначен для *in vivo* терапии для людей.

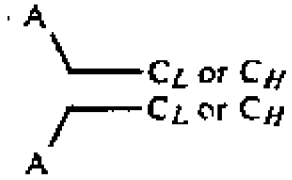
В соответствии с некоторыми вариантами осуществления IL-22-иммуноглобулиновые химерные молекулы собирают в виде мономеров, гетеро- или гомомультимеров или в виде димеров или тетрамеров. Обычно, такие собранные иммуноглобулины будут иметь известные структуры единиц, которые представлены с помощью приведенных далее схем. Основной четырехцепочечной структурной единицей является форма, в которой существуют IgG, IgD и IgE. Четырехцепочечная единица повторяется в иммуноглобулинах с более высокой молекулярной массой; IgM обычно существует в форме пентамера из основных четырехцепочечных единиц, которые удерживаются друг с другом при помощи дисульфидных связей. Глобулин IgA, и иногда глобулин IgG, также может существовать в сыворотке в мультимерной форме. В случае мультимеров каждая четырехцепочечная единица может быть одинаковой или отличаться. См. также Capon et al., патент США № 5116964, включенный в настоящий документ с помощью ссылки в полном его объеме.

На приведенных в настоящем документе схемах "A" означает по меньшей мере часть партнера по связыванию (такого как IL-22), содержащую сайт связывания, который может связываться со своим лигандом или рецептором (таким как IL-22 R); X представляет собой дополнительное средство, которые может представлять собой другой функциональный партнер по связыванию (такой же как A или другой), полипептид из множества субъединиц (цепей), как указано выше (например, интегрин), часть члена иммуноглобулинового суперсемейства, такая как вариабельный участок или домен, подобный вариабельному участку, в том числе вариабельный участок нативного или химерного иммуноглобулина, токсин, такой как экзотоксин синегнойной палочки или рицин, или полипептидное терапевтическое средство, которое в иных случаях нормально не ассоциируется с константным доменом; и V_L, V_H, C_L и C_H представляют собой вариабельные или константные домены легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина. Понятно, что эти схемы являются лишь иллюстрацией общих собранных иммуноглобулиновых структур и не охватывают все варианты. Например, понятно, что в любой из этих конструкций по желанию могут быть несколько "A" или "X".

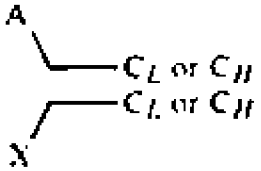
мономер



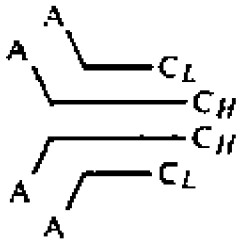
гомодимер



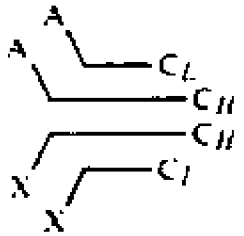
гетеродимер



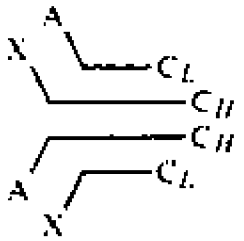
гомотетрамер



гетеротетрамеры



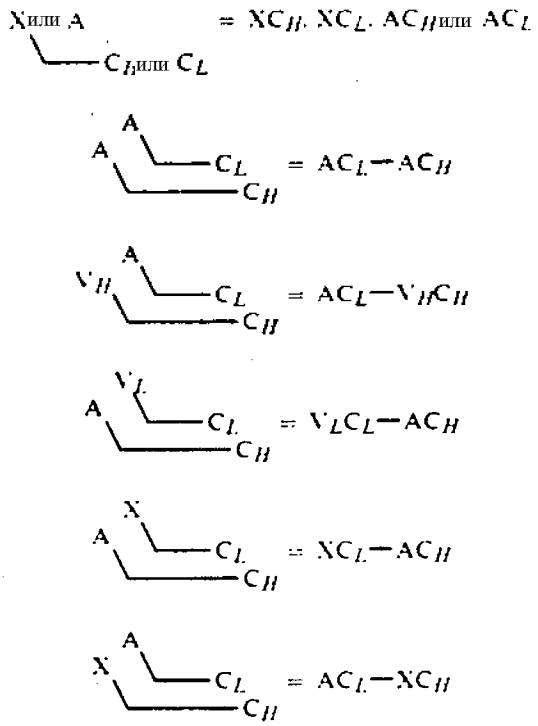
и



Понятно, что такие схемы являются лишь иллюстративными, и полагают, что цепи мультимеров связаны дисульфидными связями таким же образом, как и в нативных иммуноглобулинах. В соответствии с настоящим изобретением гибридные иммуноглобулины легко секретируются из клеток млекопитающих,

трансформированных соответствующей нуклеиновой кислотой. Секретированные формы включают формы, в которых эпитоп партнера по связыванию присутствует в димерах тяжелой цепи, мономерах или димерах легкой цепи и гетеротетрамерах тяжелой и легкой цепей, причем эпитоп партнера по связыванию присутствует в гибридизированном состоянии с одной или несколькими легкими или тяжелыми цепями, включая гетеротетрамеры, в которых замещены включительно до всех четырех аналогов вариабельных участков. Таким образом, в случае наличия отличного от партнера по связыванию домена, который подобен вариабельному, у тяжелой-легкой цепи, получают гетерофункциональное антитело.

Для сборки мономеров и гетеро- и гомомультимеров иммуноглобулинов по настоящему изобретению можно использовать цепи или основные единицы с различной структурой. Конкретные примеры таких основных единиц показаны на приведенной ниже схеме и указаны их эквиваленты (для приведенных ниже сокращенных форм формул).



Различные иллюстративные собранные новые иммуноглобулины, полученные в соответствии с настоящим изобретением, схематично приведены ниже. Помимо символов, значение которых описано выше, n представляет собой целое число, а Y обозначает сшитый при помощи ковалентной связи фрагмент.

(a) AC_L;

(b) AC_L-AC_L;

(c) $AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, V_LC_L-V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_HC_H, XC_H-V_LC_L, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$;

(d) $AC_L-AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, V_LC_L-V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_HC_H, XC_H-V_LC_L, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$;

(e) $AC_L-V_HC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, V_LC_L-V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_HC_H, XC_H-V_LC_L, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$;

(f) $V_LC_L-AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, V_LC_L-V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_HC_H, XC_H-V_LC_L, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$;

(g) $[A-Y]_n-[V_LC_L-V_HC_H]2$;

(h) XC_H or $XC_L-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$;

(i) $XC_L-XC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_{-ACH}, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$.

(j) $XC_L-V_HC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]2$

(k) $XC_H-V_LC_L-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$;

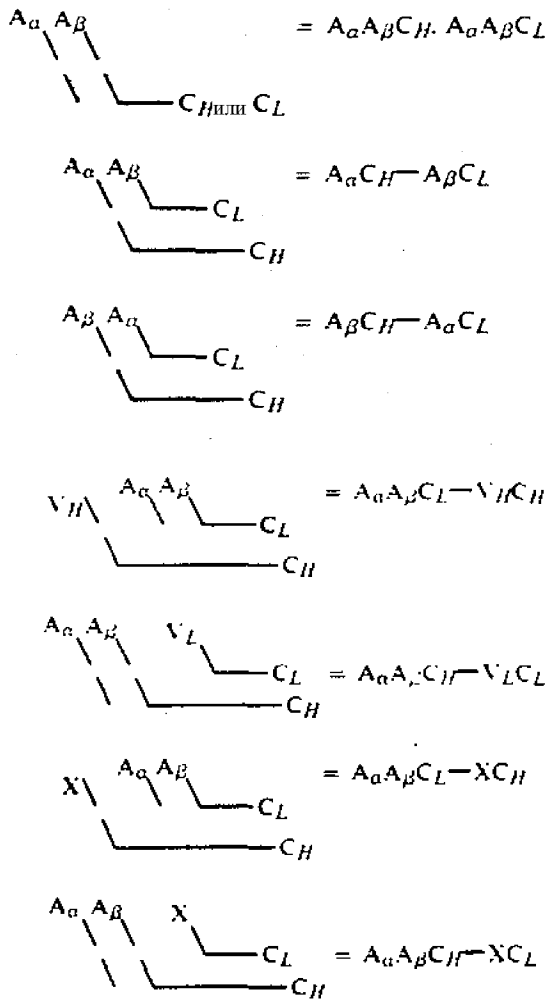
(l) $XC_L-AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, V_LC_L-V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_HC_H, XC_H-V_LC_L, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$;

(m) $AC_L-XC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, V_LC_L-V_HC_H, XC_H, XC_L, XC_L-XC_H, XC_L-V_HC_H, XC_H-V_LC_L, XC_L-AC_H$ или $AC_L-XC_H]$;

A, X, V или C могут быть модифицированы с помощью сшитого ковалентной связью фрагмента (Y) так, что они будут представлять собой $(A\text{-}Y)_n$, $(X\text{-}Y)_n$ и т. д.

Партнер по связыванию A (такой как IL-22) также может представлять собой многоцепочечную молекулу, например, с цепями, которые условно обозначены как A_α и A_β. Эти цепи в виде единицы расположены на сайтах, о которых упомянуто выше для отдельной цепи "A". Одна из множественных цепей гибридизирована с одной цепью иммуноглобулина (причем оставшиеся цепи ковалентно или нековалентно связаны с гибридизированной цепью обычным образом), или если партнер по связыванию лиганда содержит две цепи, то одна цепь отдельно гибридизирована с легкой цепью иммуноглобулина, а другая цепь с тяжелой цепью иммуноглобулина.

Основные единицы со структурами, которые показаны на приведенной ниже схеме, являются примерами основных единиц, применяемых для создания мономеров и гетеро- и гомомультимеров, особенно димеров и тримеров с многоцепочечными партнерами по связыванию лиганда:



Ниже схематически представлены различные иллюстративные новые собранные антитела с двухцепочечными партнерами по связыванию лиганда ("A_α и A_β"), используемыми в структурах единиц, которые приведены выше.

(n) $A_\alpha A_\beta C_L$—[AC_H. AC_L—AC_H. AC_L—V_HC_H. V_LC_L—AC_H. V_LC_L—V_HC_H. XC_H. XC_L. XC_L—XC_H. XC_L—V_HC_H. XC_H—V_LC_L. XC_L—AC_H. AC_L—XC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$. $A_\alpha C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L. $A_\alpha A_\beta C_L$—XC_H.или $A_\alpha A_\beta C_H$—XC_L]:

(o) $A_\alpha A_\beta C_H$—[AC_H. AC_L—AC_H. AC_L—V_HC_H. V_LC_L—AC_H. V_LC_L—V_HC_H. XC_H. XC_L. XC_L—XC_H. XC_L—V_HC_H. XC_H—V_LC_L. XC_L—AC_H. AC_L—XC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$. $A_\alpha C_L$—$A_\beta C_H$. $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L. $A_\alpha A_\beta C_L$—XC_H. or $A_\alpha A_\beta C_H$—XC_L].

(p) $A_\alpha C_L$—$A_\beta C_H$—[AC_H. AC_L—AC_H. AC_L—V_HC_H. V_LC_L—AC_H. V_LC_L—V_HC_H. XC_H. XC_L. XC_L—XC_H. XC_L—V_HC_H. XC_H—V_LC_L. XC_L—AC_H. AC_L—XC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$. $A_\alpha C_L$—$A_\beta C_H$. $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L. $A_\alpha A_\beta C_L$—XC_H. or $A_\alpha A_\beta C_H$—XC_L].

(q) $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$—[AC_H. AC_L—AC_H. AC_L—V_HC_H. V_LC_L—AC_H. V_LC_L—V_HC_H. XC_H. XC_L. XC_L—XC_H. XC_L—V_HC_H. XC_H—V_LC_L. XC_L—AC_H. AC_L—XC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$. $A_\alpha C_L$—$A_\beta C_H$. $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L. $A_\alpha A_\beta C_L$—XC_H. or $A_\alpha A_\beta C_H$—XC_L]:

(r) $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H—[AC_H. AC_L—AC_H. AC_L—V_HC_H. V_LC_L—AC_H. V_LC_L—V_HC_H. XC_H. XC_L. XC_L—XC_H. XC_L—V_HC_H. XC_H—V_LC_L. XC_L—AC_H. AC_L—XC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$. $A_\alpha C_L$—$A_\beta C_H$. $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L. $A_\alpha A_\beta C_L$—XC_H.или $A_\alpha A_\beta C_H$—XC_L]:

(s) $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L—[AC_H. AC_L—AC_H. AC_L—V_HC_H. V_LC_L—AC_H. V_LC_L—V_HC_H. XC_H. XC_L. XC_L—XC_H. XC_L—V_HC_H. XC_H—V_LC_L. XC_L—AC_H. AC_L—XC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$. $A_\alpha C_L$—$A_\beta C_H$. $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L. $A_\alpha A_\beta C_L$—XC_H.или $A_\alpha A_\beta C_H$—XC_L]:

(t) $A_\alpha A_\beta C_L$—XC_H—[AC_H. AC_L—AC_H. AC_L—V_HC_H. V_LC_L—AC_H. V_LC_L—V_HC_H. XC_H. XC_L. XC_L—XC_H. XC_L—V_HC_H. XC_H—V_LC_L. XC_L—AC_H. AC_L—XC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$. $A_\alpha C_L$—$A_\beta C_H$. $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L. $A_\alpha A_\beta C_L$—XC_H.или $A_\alpha A_\beta C_H$—XC_L]:

(u) $A_\alpha A_\beta C_H$—[AC_H. AC_L—AC_H. AC_L—V_HC_H. V_LC_L—AC_H. V_LC_L—V_HC_H. XC_H. XC_L. XC_L—XC_H. XC_L—V_HC_H. XC_H—V_LC_L. XC_L—AC_H. AC_L—XC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$. $A_\alpha C_L$—$A_\beta C_H$. $A_\beta C_L$—$A_\alpha C_H$. $A_\alpha A_\beta C_L$—V_HC_H. $A_\alpha A_\beta C_H$—V_LC_L. $A_\alpha A_\beta C$—XC_H.или $A_\alpha A_\beta C_H$—XC_L].

В приведенных выше таблицах в показанных структурах видны лишь основные особенности, например, в них не показаны ни соединяющие элементы (J) или другие домены иммуноглобулинов, ни дисульфидные связи. Они опущены ради краткости. Тем не менее, если такие домены необходимы для связывающей активности, их следует строить так, чтобы они присутствовали в обычных положениях, которые они занимают в партнере по связыванию или молекулах иммуноглобулина в зависимости от конкретного случая.

ДНК, кодирующая константные участки легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, известна, или может быть легко получена из библиотек кДНК, или же синтезирована. См., например, 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); и Morrison et al; Ann. Rev. Immunol. 2:239-256 (1984). В настоящем документе приведена последовательность ДНК, кодирующая IL-22 человека с эндогенной лидерной последовательностью (SEQ ID NO:70). Последовательности ДНК, кодирующие других

необходимых партнеров по связыванию, которые известны или могут быть легко получены из библиотек кДНК, являются подходящими для осуществления настоящего изобретения на практике.

ДНК, кодирующая химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению, трансфицируют в клетку-хозяина для экспрессии. Если необходимы мультимеры, то клетку-хозяина трансформируют посредством ДНК, кодирующей каждую цепь, которая будет составлять мультимер, причем клетку-хозяина оптимально выбрать такую, чтобы она могла собирать цепи мультимеров необходимым образом. Если клетка-хозяин вырабатывает иммуноглобулин до трансфекции, то необходимо лишь трансфицировать партнером по связыванию, гибридизированным с легкой или с тяжелой цепью, с получением гетероантитела. Вышеупомянутые иммуноглобулины с одним или несколькими плечами, несущими домен партнера по связыванию, и одним или несколькими плечами, несущими парные вариабельные участки, дают в результате двойную специфичность к лиганду партнера по связыванию и к антигену или терапевтическому фрагменту. Множество одновременно трансформированных клеток применяют с описанными выше рекомбинантными способами для получения полипептидов с множественными специфичностями, таких как описываемые выше гетеротетрамерные иммуноглобулины.

Хотя наличие легкой цепи иммуноглобулина не является необходим в иммуноадгезинах по настоящему изобретению, легкая цепь иммуноглобулина может присутствовать в равной степени ковалентно связанной с химерным полипептидом с тяжелой цепью иммуноглобулина и IL-22. В этом случае ДНК, кодирующая легкую цепь иммуноглобулина, обычно совместно экспрессируется с ДНК, кодирующей химерный белок с тяжелой цепью иммуноглобулина и IL-22. При секреции гибридная тяжелая цепь и легкая цепь будут ковалентно связываться с образованием иммуноглобулин-подобной структуры, содержащей две, связанные дисульфидными связями, пары легкая цепь-тяжелая цепь иммуноглобулина. Способы, подходящие для получения таких структур, раскрыты, например, в патенте США № 4816567, выданном 28 марта 1989 года. Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих целевые белки векторов включают описываемые в настоящем документе прокариотические или эукариотические клетки. Например, химерный белок IL-22 может продуцироваться у бактерий, особенно если в гликозилирование и Fc-эффекторная функция не являются необходимыми или наносят ущерб. Для экспрессии полипептидов в бактериях, см., например, патенты США № 5648237, 5789199 и

5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, в которой описана экспрессия фрагментов антител у *E. coli*.) После экспрессии химерный белок Fc может быть выделен из бактериальной клеточной массы в растворимой фракции и может быть дополнительно очищен. Как проиллюстрировано в разделе примеров, способы дополнительной очистки включают без ограничения очистку с применением колонки с белком А.

Помимо прокариот, эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии, в том числе штаммы грибов и дрожжей, чьи пути гликозилирования были "гуманизированы", что приводит в результате к продуцированию антитела с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных белков также получают от многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Было обнаружено множество бакуловирусных штаммов, которые могут быть использованы в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры растительных клеток также можно использовать в качестве хозяев. См., например, патенты США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описывающие методику PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

В качестве хозяев также могут быть использованы клетки позвоночных. Например, могут быть пригодны линии клеток млекопитающих, которые адаптированы для роста в суспензии. Другими примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 клеток почки мартышки, трансформированная посредством SV40 (COS-7); линия клеток первичной почки человека (293 или клетки 293, которая описана, например, в работе Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59(1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (клетки TM4, которые описаны, например, в работе Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251(1980)); клетки почки мартышки (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки цервикальной карциномы человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, которые описаны, например, в работе Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*

383:44-68 (1982); MRC 5 клетки и FS4 клетки. Другие пригодные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), в том числе клетки DHFR⁻CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216(1980)); и линии миеломных клеток, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых подходящих для продуцирования антитела линий клеток-хозяев млекопитающих см., например, в работе Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

D. <u>Агонисты IL-22</u>

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к агонистам IL-22 для вариантов осуществления способа. Агонисты IL-22 обладают биологической активностью IL-22, как указано в настоящем документе. В соответствии с одним вариантом осуществления агонист IL-22 представляет собой антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к IL-22 представляет собой агонистическое антитело, которое стимулирует взаимодействие IL-22 с IL-22R. В соответствии с отдельным вариантом осуществления агонист IL-22 представляет собой антитело, которое связывает IL-22BP, и блокирует или ингибирует связывание IL-22BP с IL-22 и, таким образом, индуцирует или повышает активность IL-22 (например, связывание с IL-22R). В соответствии с другим вариантом осуществления агонист IL-22 представляет собой олигопептид, который связывается с IL-22. Олигопептиды можно синтезировать химическими способами с применением технологии синтеза олигопептидов или можно получить и очистить с применением рекомбинантной технологии. Таким олигопептиды обычно составляют по меньшей мере 5 аминокислот в длину, альтернативно, по меньшей мере приблизительно 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 или 100 аминокислот в длину. Такие олигопептиды можно выявить без неоправданной постановки эксперимента с применением хорошо известных методик. В этом отношении следует отметить, что методики скрининга библиотек олигопептидов, которые могут специфично связываться с полипептидом-мишенью, хорошо известны из уровня техники (см., например, патенты США №№ 5556762, 5750373, 4708871, 4833092, 5223409, 5403484, 5571689, 5663143; публикации PCT № WO 84/03506 и 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., in 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, и Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

В соответствии с еще одним вариантом осуществления агонист IL-22 по настоящему изобретению представляет собой органическую молекулу, которая связывается с IL-22, отличную от олигопептида или антитела, которые описаны в настоящем документе. Органическая молекула может представлять собой, например, малую молекулу. Органическую молекулу, которая связывается с IL-22, можно выявить и синтезировать химическими способами с применением известной методологии (см., например, публикации PCT заявок №№ WO00/00823 и WO00/39585). Такие органические молекулы обычно имеют размер менее чем приблизительно 2000 дальтон, альтернативно, имеют размер менее чем приблизительно 1500, 750, 500, 250 или 200 дальтон, причем такие органические молекулы, которые могут связываться с IL-22 по настоящему изобретению, можно выявить без неоправданной постановки эксперимента с применением хорошо известных методик. В этом отношении следует отметить, что методики скрининга библиотек органических молекул в отношении молекул, которые могут связываться с полипептидом-мишенью, хорошо известны из уровня техники (см., например, публикации PCT №№ WO00/00823 и WO00/39585). В соответствии с отдельным вариантом осуществления агонист IL-22 представляет собой органическую молекулу, которая связывает IL-22BP, и блокирует или ингибирует связывание IL-22BP с IL-22 и, таким образом, индуцирует или повышает активность IL-22 (например, связывание с IL-22R). В соответствии с еще одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к агонистам IL-22. Иллюстративные агонисты включают без ограничения нативный IL-22 или IL-22R; фрагменты, варианты или модифицированные формы IL-22 или IL-22R, которые сохраняют по меньшей мере одну активность нативного полипептида; средства, которые могут связывать и активировать IL-22R; и средства, которые индуцируют сверхэкспрессию IL-22 или IL-22R или нуклеиновых кислот, кодирующих IL-22 или IL-22R.

E. Анализы

Предлагаемый согласно настоящему изобретению химерный белок IL-22 Fc можно выявить, отобрать при скрининге или охарактеризовать по его физическим/химическим свойствам и/или биологическим активностям с помощью различных известных из уровня техники анализов.

1. Анализы связывания и другие анализы

В соответствии с одним аспектом химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению тестируют в отношении его рецептор-связывающей активности, например, при помощи таких известных способов, как ELISA, вестерн-блоттинг, связывание на клеточной поверхности по Скэтчарду, поверхностный плазмонный резонанс. В соответствии с другим аспектом для выявления антитела, которое конкурирует с химерным белком IL-22 Fc за связывание с рецептором IL-22, можно использовать конкурентные анализы. В соответствии с другим аспектом химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению можно применять для детекции наличия или количестве рецептора IL-22 или IL22-связывающего белка (растворимого рецептора), присутствующего в биологическом образце. В соответствии с другим аспектом химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению можно применять для детекции наличия или количества рецептора IL-22, присутствующего в биологическом образце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец сначала блокируют неспецифичным изотипическим контрольным антителом для насыщения всех Fc рецепторов в образце.

2. Анализы активности

В соответствии с одним аспектом предложены анализы для выявления биологической активности химерного белка IL-22 Fc. Биологическая активность полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc может включать, например, связывание с рецептором IL-22, стимуляцию проведения сигнала IL-22 и индукцию экспрессии STAT3, RegIII и/или PancrePAP. Дополнительно, в случае сердечно-сосудистого заболевания или состояния биологическая активность может включать воздействие на формирование атеросклеротических бляшек, в частности для подавления формирования атеросклеротических бляшек. Ингибирование формирования бляшек можно оценить любым подходящим способом визуализации, известным специалисту в настоящей области.

F. Конъюгаты

Настоящее изобретение также относится к конъюгатам, включающим описанный в настоящем документе химерный белок IL-22 Fc, конъюгированным с одним или несколькими средствами для детекции, формирования составов, увеличения периода полужизни, уменьшения иммуногенности или проникновения в ткани. Иллюстративная конъюгация включает без ограничения пегилирование и присоединение радиоактивных изотопов.

В соответствии с другим вариантом осуществления конъюгат включает описанный в настоящем документе химерный белок IL-22 Fc, конъюгированный с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Для получения радиоконъюгатов доступен ряд радиоактивных изотопов. Примеры включают At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. При применении радиоконъюгата для детекции он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например, tc99m или I123, или спиновую метку для ядерной магнитно-резонансной (NMR) визуализации (также известной как магнитно-резонансная визуализация, mri), такую как опять-таки йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

G. Способы и композиции для детекции

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любая из предлагаемых в настоящем документе химер IL-22 Fc пригодна для детекции наличия рецептора IL-22 в биологическом образце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно включает этап блокировки всех Fc рецепторов в образце при помощи неспецифичного изотипического контрольного антитела. Применяемый в настоящем документе термин “детекция” охватывает количественную и качественную детекцию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец содержит клетку или ткань, такую как эпителиальные ткани.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения в способе детекции. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу детекции наличия рецептора IL-22 в биологическом образце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ включает приведение в контакт биологического образца с описанным в настоящем документе химерным белком IL-22 Fc в условиях,

позволяющих связывание химерного белка IL-22 Fc с рецептором IL-22, и детекцию того, сформировался ли комплекс между химерным белком IL-22 Fc и рецептором IL-22. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ дополнительно включает этап блокировки всех Fc рецепторов в образце при помощи неспецифичного изотипического контрольного антитела. Такой способ может представлять собой *in vitro* или *in vivo* способ. В соответствии с одним вариантом осуществления химерный белок IL-22 Fc применяют для выбора субъектов, приемлемых для терапии при помощи химерного белка IL-22 Fc, например, если рецептор IL-22 представляет собой биомаркер для выбора больных.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерным белкам IL-22 Fc. Метки включают без ограничения метки или фрагменты, которые детектируют непосредственно (такой как флуоресцентные, хромофорные, электроноплотные, хемилюминисцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые детектируют опосредованно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Иллюстративные метки включают без ограничения радиоизотопы ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H и ^{131}I, флуорофоры, такие как редкоземельные хелаты или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люцифераза светлячка и бактериальная люцифераза (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазинедионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, β-галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахарид-оксидазы, например, глюкозооксидаза, галактозоксидаза и глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, сшитые с ферментом, который использует перекись водорода для окисления исходного красителя, таким как HRP, лактопероксидаза, или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, метки на основе бактериофагов, устойчивые свободные радикалы и др.

H. <u>Фармацевтические составы</u>

Композиции на основе IL-22 (которые в соответствии с некоторыми вариантами осуществления включают химерные белки IL-22 Fc и полипептид IL-22 или агонисты) согласно настоящему изобретению будут составлять в смесь, разделять на дозы и вводить таким образом, чтобы это отвечало требованиям надлежащей медицинской практики. Рассматриваемые в данном контексте факторы включают конкретное

подвергаемое лечению нарушение, конкретное подвергаемое лечению млекопитающее, клиническое состояние отдельного субъекта, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. В соответствии с одним вариантом осуществления композицию можно применять для увеличения продолжительность существования человека, подверженного развитию или с диагнозом заболевания или болезненного состояния. Продолжительность существования определяют как время от первого введения лекарственного средства до смерти.

Фармацевтические составы готовят с помощью известных из уровня техники стандартных способов, включающих смешивание активного ингредиента, имеющего необходимую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) и *Remington's Pharmaceutical Sciences* 20th edition, ed. A. FGennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают без ограничения буферы, такие как фосфатный, цитратный и с другими органическими кислотами; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметамония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; феноловый, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексные соединения металлов (например, комплексное соединение Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители в настоящем документе дополнительно включают средства диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, такие как

растворимые гликопротеины гиалуронидазы с нейтральной активностью (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые иллюстративные sHASEGP и способы применения, включающие rHuPH20, описаны в публикации патентах США № 2005/0260186 и № 2006/0104968. В соответствии с одним аспектом sHASEGP комбинируют с одним или несколькими дополнительными глюкозаминогликанами, такими как хондроитиназы.

Необязательно, но предпочтительно, состав содержит фармацевтически приемлемую соль, предпочтительно хлорид натрия и предпочтительно в приблизительно физиологических концентрациях.

Необязательно, составы по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый консервант. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления концентрация консерванта варьирует в диапазоне от 0,1 до 2,0%, обычно в объемном содержании. Подходящие консерванты включают консерванты, известные в области фармацевтики. Предпочтительными консервантами являются бензиловый спирт, фенол, м-крезол, метилпарабен, бензалкония хлорид и пропилпарабен. Необязательно, составы по настоящему изобретению могут включать фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество в концентрации от 0,005 до 0,02%.

Состав по настоящему изобретению также может содержать более одного активного соединения при необходимости для конкретного подвергаемого лечению симптома, предпочтительно соединения с дополняющими активностями, которые не оказывают отрицательного действия друг на друга. Такие молекулы предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для достижения поставленной цели.

Иллюстративные лиофилизированные составы описаны в патенте США № 6267958. Водные составы включают составы, описанные в патенте США № 6171586 и WO2006/044908, причем последние составы включают гистидин-ацетатный буфер.

Состав по настоящему изобретению также может содержать более одного активного ингредиента при необходимости для конкретного подвергаемого лечению симптома, предпочтительно соединения с дополняющими активностями, которые не оказывают отрицательного действия друг на друга. Например, может быть необходимо дополнительное внесение стероида, антагониста TNF или других противоспалительных терапевтических средств. Такие активные ингредиенты предпочтительно присутствуют

в комбинации в количествах, которые являются эффективными для достижения поставленной цели.

Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, с помощью методик коацервации или с помощью полимеризация по границе раздела фаз, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли-(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах для доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можно приготовить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие химерный белок IL-22 Fc, причем такие матрицы имеют форму изделий с определенной формой, например, пленки или микрокапсулы. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, содержащие в составе сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролидацетат) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Несмотря на то, что такие полимеры, как этиленвинилацетат и сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты обеспечивает высвобождение молекул на протяжении более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Если заключенные в капсулу антитела остаются в организме в течение длительного периода времени, они могут денатурировать или образовать агрегат в результате воздействия влаги при 37°C, что в итоге приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. В зависимости от задействованного механизма, можно разработать рациональные стратегии для стабилизации. Например, если выявлено, что механизм агрегации представляет собой формирование межмолекулярных S-S связей в результате тио-дисульфидного взаимообмена, то стабилизации можно достичь путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислотных растворов, контроля за содержанием влаги, применения соответствующих добавок и разработки специфических полимерных матричных композиций.

Фармацевтическую композицию для местного применения можно составить в смесь, например, в форме геля для местного применения. См., например, US 4717717, US 5130298, US 5427778, US 5457093, US 5705485, US 6331309 и WO2006/138468. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию можно составить в смесь в присутствии производных целлюлозы. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления состав для местного применения перед применением можно восстановить из лиофилизированного состава при помощи достаточного количества буфера или разбавителя. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc составляют в смесь для местного применения на субъекте с нарушением заживления эпителиальных ран. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления заживление эпителиальных ран происходит на коже. В соответствии с некоторыми другими определенными вариантами осуществления субъектом является человек с нарушением заживления ран. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления состав для местного применения, содержащий химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению, можно применять для улучшения заживления ран после внутренних или внешних хирургических разрезов.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc для применении в ускорении, стимуляции или улучшении заживления ран находится в составе геля для местного применения, например, в предварительно заполненном шприце или емкости, или альтернативно соединение по настоящему изобретению можно смешивать с гелевой матрицей непосредственно перед местным применением на больном. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления также применяют местно дополнительное терапевтическое средство, либо одновременно, либо последовательно. Также необязательно можно применять другие пути введения, например, вводить с помощью любого подходящего способа, включая без ограничения парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное, интрацереброспинальное, подкожное, интраартикулярное, внутрисуставное, подоболочечное, пероральное и интраназальное введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение.

Как правило, для заживления ран полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc составляют в смесь для сайт-специфической доставки. При местном нанесении полипептид IL-22 или химеру IL-22 Fc предпочтительно комбинируют с другими

ингредиентами, такими как носители и/или адъюванты. Ограничения по природе таких других ингредиентов отсутствуют, за исключением того, что они должны быть фармацевтически приемлемыми и эффективными для их задуманного применения и не могут снижать активность активных ингредиентов композиции. Примеры подходящих наполнителей включают мази, кремы, гели, спреи или суспензии с очищенным коллагеном или без него. Композициями также можно пропитать стерильные повязки, трансдермальные пластыри, пластыри и бинты, необязательно в жидкой или полутвердой форме. Также можно применять матрицы из окисленной регенерированной целлюлозы/коллагена, например, PROMOGRAN Matrix Wound Dressing или PROMOGRAN PRISMA MATRIX.

Можно приготовить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие полипептид по настоящему изобретению, причем такие матрицы имеют форму изделий с определенной формой, например, пленки или микрокапсулы. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, содержащие в составе сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролидацетат), сополимер молочной и гликолевой кислоты (PLGA) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Несмотря на то, что такие полимеры, как этиленвинилацетат и сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты обеспечивает высвобождение молекул на протяжении более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Если заключенные в капсулу полипептиды остаются в организме в течение длительного периода времени, они могут денатурировать или образовать агрегат в результате воздействия влаги при 37°C, что в итоге приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. В зависимости от задействованного механизма можно разработать рациональные стратегии для стабилизации. Например, если выявлено, что механизм агрегации представляет собой формирование межмолекулярных S-S связей в результате тио-дисульфидного взаимообмена, то стабилизации можно достичь путем модификации сульфгидрильных остатков,

лиофилизации из кислотных растворов, контроля за содержанием влаги, применения соответствующих добавок и разработки специфических полимерных матричных композиций.

Для получения гелеобразного состава полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc, составленный в жидкой композиции, можно смешать с эффективным количеством водорастворимого полисахарида или синтетического полимера для формирования геля (например, гелеобразующего средства), такого как полиэтиленгликоль, для формирования состава для местного нанесения с соответствующей вязкостью. Полисахарид или гелеобразующее средство, которое можно применять, включает, например, производные целлюлозы, такие как этерифицированные производные целлюлозы, в том числе алкилцеллюлозы, гидроксиалкилцеллюлозы и алкилгидроксиалкилцеллюлозы, например, метилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, блок-сополимеры POE-POP, полоксамер USP с различной степенью чистоты, гиалуроновую кислоту, полиакриловую кислота, такую как карбопол 940, крахмал и фракционированный крахмал, агар, альгиновую кислоту и альгинаты, гуммиарабик, пуллулан, агарозу, каррагенан, декстраны, декстрин, фруктаны, инулин, маннаны, ксиланы, арабинаны, хитозаны, гликогены, глюканы и синтетические биополимеры, а также камеди, такие как ксантановая камедь, гуаровая камедь, камедь бобов рожкового дерева, гуммиарабик, трагакантовая камедь и камедь карайи, и их производные, комбинации и смеси. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения гелеобразующее средство в настоящем документе представляет собой средство, которое, например, является инертным по отношению к биологическим системам, нетоксичным, простым для приготовления и/или не слишком жидким или вязким и не будет дестабилизировать содержащийся в нем полипептид IL-22 или химеру IL-22 Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению полисахарид представляет собой этерифицированное производное целлюлозы, в соответствии с другим вариантом осуществления полисахаридом, который хорошо подвергается определению, очистке и приведен в USP, например, метилцеллюлозой и производными гидроксиалкилцеллюлозы, такими как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза и гидроксипропилметилцеллюлоза (все вместе называемыми целлюлозными средствами). В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления полисахарид представляет собой гидроксиэтилметилцеллюлозу или гидроксипропилметилцеллюлозу.

Пригодный для гелеобразования полиэтиленгликоль, как правило, представляет собой смесь низко- и высокомолекулярных полиэтиленгликолей для получения соответствующей вязкости. Например, смесь полиэтиленгликоля с молекулярной массой 400-600 с полиэтиленгликолем с молекулярной массой 1500 будет эффективна для такой цели при смешивании в соответствующем соотношении до получения пасты.

Термин "водорастворимый", применительно к полисахаридам и полиэтиленгликолям, понимают как включающий коллоидные растворы и дисперсии. В целом, растворимость производных целлюлозы определяется степенью замещения эфирных групп, и стабилизирующие производные, пригодные для настоящего изобретения, должны иметь достаточное количество таких эфирных групп на ангидроглюкозное звено в целлюлозной цепи для придания производным водорастворимых свойств. Обычно достаточной является степень замещения эфирных групп, составляющая по меньшей мере 0,35 эфирных групп на ангидроглюкозное звено. Дополнительно, производные целлюлозы могут иметь форму солей щелочных металлов, например, солей Li, Na, K или Cs.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в геле используют метилцеллюлозу, например, она составляет приблизительно 1-5% или приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4% или приблизительно 5% геля, а полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc присутствует в количестве, составляющем приблизительно 50-2000 мкг, 100-2000 мкг или 100-1000 мкг на мл геля. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc для заживления ран путем местного применения может составлять от приблизительно 25 мкг до приблизительно 500 мкг, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 300 мкг, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 250 мкг, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 250 мкг, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 150 мкг, приблизительно 75 мкг, приблизительно 100 мкг, приблизительно 125 мкг, приблизительно 150 мкг, приблизительно 175 мкг, приблизительно 200 мкг, приблизительно 225 мкг, приблизительно 250 мкг, приблизительно 300 мкг или приблизительно 350 мкг на $см^2$ площади раны.

Составы, подлежащие применению для введения *in vivo*, обычно являются стерильными. Стерильности можно легко достичь, например, при помощи фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Настоящее изобретение относится к дозировкам для терапевтических средств на основе IL-22. Например, в зависимости от типа и тяжести заболевания, от приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-20 мг/кг) полипептида является начальной предполагаемой дозировкой для введения субъекту, независимо от того, например, за одно или за несколько раздельных введений или путем непрерывной инфузии. Типичная суточная дозировка может варьировать от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от упомянутых ранее факторов. Для повторных введений на протяжении нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не происходит необходимое подавление симптомов заболевания. Тем не менее, пригодными могут быть другие режимы дозирования. Прогресс такой терапии легко отслеживать при помощи традиционных методик и анализов.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая дозировка полипептида по настоящему изобретению (при применении отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами) будет зависеть от типа подлежащего лечению заболевания, типа полипептида, тяжести и течения заболевания, независимо от того, вводят ли полипептид с целью предупреждения или для терапевтических целей, предварительной терапии, истории болезни и реакции субъекта на полипептид и компетенции лечащего врача. Полипептид предпочтительно вводят субъекту за один раз или в течении серии лечебных процедур. В зависимости от типа и тяжести заболевания начальная предполагаемая дозировка для введения субъекту может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до 20 мг/кг (например, 0,1 мг/кг - 15 мг/кг) полипептида, независимо от того, например, за одно или за несколько раздельных введений или путем непрерывной инфузии. Одна типичная суточная дозировка может варьировать от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от упомянутых ранее факторов. Для повторных введений на протяжении нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно будут продолжать до тех пор, пока не произойдет необходимое подавление симптомов заболевания. Одна иллюстративная дозировка полипептида может находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. Таким образом, субъекту можно ввести одну или несколько

доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 10 мг/кг, 12 мг/кг, 15 мг/кг или 20 мг/кг (или любую их комбинацию). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту можно ввести приблизительно 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5,0 мг/кг, 6,0 мг/кг, 7,0 мг/кг, 8,0 мг/кг, 9,0 мг/кг, 10 мг/кг, 12 мг/кг, 15 мг/кг или 20 мг/кг (или любую их комбинацию). Такие дозы можно вводить с промежутками, например, раз в неделю, раз в две недели или раз в три недели (например, так, чтобы субъект получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шесть доз полипептида). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу с последующим введением одной или нескольких более низких доз. Иллюстративный режим дозирования включает введение начальной ударной дозы, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующим введение еженедельной поддерживающей дозы, составляющей приблизительно 2 мг/кг антитела. Тем не менее, пригодными могут быть другие режимы дозирования. Прогресс такой терапии легко отслеживать при помощи традиционных методик и анализов.

Соединения по настоящему изобретению для предупреждения или лечения сердечно-сосудистого заболевания или состояния, метаболического синдрома, острого эндотоксикоза или сепсиса или сахарного диабета, как правило, вводят при помощи внутривенной инъекции.

Также можно применять другие способы введения, которые включают без ограничения местное применение, парентеральное, такое как внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное, интраназальное, глазное, внутриглазное, в стекловидное тело, внутриочаговое, интрацереброспинальное, интраартикулярное, внутрисуставное, подоболочечное, пероральное или ингаляционное введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, описанные в настоящем документе соединения вводят человеку в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде струйного или непрерывной инфузии на протяжении некоторого периода времени.

I. Терапевтические способы и композиции

В терапевтических способах можно применять любой из приведенных в настоящем документе химерных белков IL-22 Fc, или полипептидов IL-22, или агонистов IL-22.

a) <u>Воспалительное заболевание кишечника</u>

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения в качестве лекарственного препарата. В соответствии со следующими аспектами настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения при лечении IBD, в том числе UC и CD. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения в способе лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения в способе лечения индивидуума с UC или CD, включающем введение индивидууму эффективного количества химерного белка IL-22 Fc. В соответствии с одним вариантом осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, которое описано ниже. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения при повышении пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток. В соответствии с некоторыми определенными вариантами осуществления эпителиальная ткань представляет собой кишечную эпителиальную ткань. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения в способе повышения пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества химерного белка IL-22 Fc для повышения пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток. В соответствии с еще одними вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения при лечении сахарного диабета, особенно сахарного диабета II типа, заживлении диабетических ран, лечении метаболических синдромов и атеросклероза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к химерному белку IL-22 Fc для применения в способе лечения сахарного диабета, особенно сахарного диабета II типа, заживлении диабетических ран, лечении метаболических синдромов и атеросклероза у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества химерного белка IL-22 Fc. См. заявки компании Genentech с номерам дел в книге записей PR5586, заявка с серийным № 61/800795 под заголовком “Применение полипептида IL-22 для заживления ран (Using

an IL-22 polypeptide for wound healing)", и PR5590, заявка с серийным № 61/801144 под заголовком "Способы лечения сердечно-сосудистых состояний и метаболического синдрома с применением полипептида IL-22 (Methods of treating cardiovascular conditions and metabolic syndrome using an IL-22 polypeptide)", обе поданы 15 марта 2013 года. Раскрытия обеих заявок включены в настоящий документ с помощью ссылки в полном их объеме. "Индивидуум", или "субъект", или "больной" в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления предпочтительно является человеком.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к применению полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc в производстве или получении лекарственного препарата. В соответствии с одним вариантом осуществления лекарственный препарат предназначен для лечения IBD и заживления ран. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления лекарственный препарат предназначен для применения в способе лечения IBD и заживления ран, включающем введение индивидууму с IBD эффективного количества лекарственного препарата. В соответствии с одним вариантом осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, которое описано ниже. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления лекарственный препарат предназначен для подавления воспалительной реакции в эпителиальных клетках кишечника. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления лекарственный препарат предназначен для применения в способе повышения пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток у индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества лекарственного препарат для повышения пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток. "Индивидуум" в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления может быть человеком.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения IBD, в том числе UC и CD. В соответствии с одним вариантом осуществления способ включает введение индивидууму с IBD эффективного количества полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc. В соответствии с одним вариантом осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, которое описано

ниже. “Индивидуумом” в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления может быть человек.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу повышения пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток у индивидуума. В соответствии с одним вариантом осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc для повышения пролиферации, дифференцировки и/или миграции эпителиальных клеток. В соответствии с одним вариантом осуществления “индивидуумом” является человек.

b) Другие показания к применению

Настоящее изобретение относится к терапевтическим средствам на основе IL-22 от сердечно-сосудистых заболеваний и состояний, метаболического синдрома, острого эндотоксикоза и сепсиса и сахарного диабета. Для предупреждения, лечения или уменьшения тяжести указанного заболевания или состояния соответствующая дозировка соединения по настоящему изобретению будет зависеть от типа подлежащего лечению заболевания или состояния, которые указаны выше, тяжести и течения заболевания или состояния, независимо от того, вводят ли средство с целью предупреждения или для терапевтических целей, предварительной терапии, истории болезни субъекта и реакции на соединение и компетенции лечащего врача. Соединение предпочтительно вводят субъекту за один раз или в течении серии лечебных процедур. Предпочтительно, желательно до тестирования на людях построить кривую зависимости доза-реакция и определить фармацевтическую композицию по настоящему изобретению сначала in vitro, а затем в подходящих животных моделях.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к способам лечения сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, метаболического синдрома, острого эндотоксикоза и сепсиса и связанного с инсулином нарушения. В соответствии с одним вариантом осуществления способ включает введение нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc или агониста IL-22. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу задержки или замедления прогрессирования сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, метаболического синдрома и связанного с инсулином нарушения. В соответствии с одним вариантом осуществления способ включает введение субъекту с диагнозом заболевания, состояния или нарушения эффективного

количества полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc или агониста IL-22. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к способу предупреждения проявления признаков сердечно-сосудистого заболевания или нарушения и связанного с инсулином нарушения. В соответствии с одним вариантом осуществления способ включает введение эффективного количества полипептида IL-22, химерного белка IL-22 Fc или агониста IL-22 субъекту, подверженному риску заболевания, состояния или нарушения, причем полипептид IL-22, химерный белок IL-22 Fc или агонист IL-22 эффективен против развития признаков заболевания, состояния или нарушения.

Сердечно-сосудистые заболевания и состояния

В соответствии с одним аспектом полипептиды IL-22, химерные белки IL-22 Fc и агонисты IL-22 обеспечивают предупреждающий или профилактический эффект против развития или прогрессирования клинических, и/или гистологических, и/или биохимических, и/или патологических признаков (в том числе как симптомов, так и объективных признаков) сердечно-сосудистых заболеваний или состояний у субъекта. В соответствии с одним вариантом осуществления заболевание или состояние представляет собой атеросклероз. В соответствии с одним вариантом осуществления признаки включают формирование атеросклеротических бляшек и/или сосудистое воспаление. В соответствии с другим вариантом осуществления субъект подвержен риску сердечно-сосудистого заболевания. В целом, подверженный риску субъект будет таким, у которого уже было сердечно-сосудистое заболевание или состояние, которые описаны в настоящем документе, или будет иметь генетическую предрасположенность к сердечно-сосудистому заболеванию или состоянию.

Эффективность лечения сердечно-сосудистых заболеваний и состояний можно измерить при помощи различных оценок, широко используемых при определении сердечно-сосудистых заболеваний. Например, можно оценить здоровье сердечно-сосудистой системы. Здоровье сердечно-сосудистой системы можно определить при помощи без ограничения, например, анализов крови (например, общего холестерина, LDL-C, HDL-C, триглецирида, С-реактивного белка, фибриногена, гомоцистеина, инсулина натощак, ферритина, липопротеина, LPS), кровяного давления, аускультации, электрокардиограммы, кардиологического стресс-теста, визуализации сердца (например, коронарной катетеризации, эхокардиограммы, внутрисосудистого

ультразвукового исследования, позитронно-эмиссионной томографии, компьютерной томографической ангиографии и магнитно-резонансной визуализации).

Метаболический синдром

В соответствии с одним аспектом полипептиды IL-22, химерные белки IL-22 Fc и агонисты IL-22 обеспечивают терапевтический, предупреждающий или профилактический эффект против развития или прогрессирования клинических, и/или гистологических, и/или биохимических, и/или патологических признаков (в том числе как симптомов, так и объективных признаков) метаболического синдрома (или метаболического нарушения или заболевания) у субъекта. В соответствии с одним или несколькими вариантами осуществления субъект подвержен риску метаболического синдрома.

Эффективность лечения метаболического синдрома можно изменить при помощи различных оценок, широко используемых при определении метаболического синдрома. Например, можно измерить ожирение. В качестве дополнительного примера можно измерить гипергликемию, дислипидемию, резистентность к инсулину, хроническое воспаление жировой ткани и/или гипертонию. Можно измерить уменьшение уровней одного или нескольких из С-реактивного белка, IL-6, LPS и ингибитора активатора плазминогена 1. Такие измерения можно проводить при помощи любых хорошо известных из уровня техники способов.

Связанные с инсулином нарушения

Для связанных с инсулином нарушений термин “лечение” относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам в отношении нарушения, причем целью является предупреждение или замедление (уменьшение) целевого патологического состояния или нарушения. Нуждающиеся в лечении субъекты включают субъектов уже имеющих связанное инсулином нарушение, а также субъектов, склонных к такому нарушению, или субъектов, у которых необходимо предупредить такое нарушение.

В соответствии с одним аспектом полипептиды IL-22, химерные белки IL-22 Fc и агонисты IL-22 обеспечивают предупреждающий или профилактический эффект против развития или прогрессирования клинических, и/или гистологических, и/или биохимических, и/или патологических признаков (в том числе как симптомов, так и объективных признаков) связанного с инсулином нарушения у субъекта. В

соответствии с одним вариантом осуществления нарушение представляет собой сахарный диабет I типа, сахарный диабет II типа или гестационный сахарный диабет. В соответствии с одним вариантом осуществления патология или патологические признаки включают одно или несколько из следующего: малой выработки инсулина поджелудочной железой или полного ее отсутствия (например, островковыми клетками), резистентности к инсулину и гипергликемии. В соответствии с другим вариантом осуществления субъект подвержен риску связанного с инсулином нарушения. В целом, подверженному риску субъект имеет генетическую предрасположенность к связанному с инсулином нарушению, подвергался воздействию вируса, который запускает аутоиммунное разрушение островковых клеток (например, вируса Эпштейна-Барра, вируса Коксаки, вируса эпидемического паротита или цитомегаловируса), страдает от ожирения, предрасположен к диабету (превышающие нормальные уровни сахара в крови) или имеет гестационный сахарный диабет.

Эффективность лечения связанного с инсулином нарушения можно изменить при помощи различных оценок, широко используемых при определении таких нарушений. Например, сахарный диабет как I типа, так и II типа можно определить при помощи одного или нескольких из следующих: теста на гликозилированный гемоглобин (A1C), теста на обычный уровень сахара в крови и теста на уровень сахара в крови натощак. I тип также можно определить с помощью тестирования на аутоиммунные антитела в крови и/или на кетоны в моче. II тип также можно определить с помощью тестирования на толерантность к пероральной глюкозе.

Острый эндотоксикоз и сепсис

В соответствии с одним аспектом полипептиды IL-22, химерные белки IL-22 Fc и агонисты IL-22 обеспечивают терапевтический, предупреждающий или профилактический эффект против развития или прогрессирования клинических, и/или гистологических, и/или биохимических, и/или патологических признаков (в том числе как симптомов, так и объективных признаков) острого эндотоксикоза, сепсиса или и того, и другого у субъекта. В соответствии с одним или несколькими вариантами осуществления субъект подвержен риску острого эндотоксикоза, сепсиса или и того, и другого.

Эффективность лечения острого эндотоксикоза, сепсиса или и того, и другого можно измерить при помощи различных оценок, широко используемых при определении острого эндотоксикоза, сепсиса или и того, и другого. Например, можно

измерить уровни LPS или маркеров воспаления. Такие измерения можно проводить при помощи любых хорошо известных из уровня техники способов.

Заживление ран

Существует ряд способов измерения заживления ран. Зачастую получают изображения для расчета линейных размеров, периметра и площади. У NIH есть свободная программа, Image J, которая позволяет проводить измерение площадей ран по изображению. Окончательный прогноз по заживлению можно получить путем экстраполяции из значений скорости начального заживления по результатам смещения контура по направлению к центру. Его производят с помощью ряда математических уравнений, наиболее распространенным из который является модифицированное уравнение Гильмана. В дополнение к визуальному осмотру измерение заживления ран можно также дополнить спектроскопическими способами или MRI. См., например, Dargaville et al., Biosensors Bioelectronics, 2013, 41:30-42, Tan et al., 2007, British J. Radiol. 80:939-48. Если заживление является медленным/неполноценным, то можно взять биопсии краев раны для исключения или определения инфекции и злокачественного новообразования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ускорение или улучшение заживления ран можно оценить путем сравнения закрытия ран у IL-22-обработанных и контрольных ран. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ускорение или улучшение заживления ран по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% быстрее или лучше, чем у контроля.

В соответствии с некоторым аспектом настоящее изобретение относится к способам стимуляции/ускорения/улучшения заживления ран с активной инфекцией, микробиологическим загрязнением или колонизацией в ране или без них. Полипептиды IL-22, химерные белки IL-22 Fc или агонисты IL-22 можно применять для лечения инфицированных ран или стимуляции/ускорения/улучшения заживления инфицированных ран. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептиды IL-22, химерные белки IL-22 Fc или агонисты IL-22 можно применять для лечения ран или стимуляции/ускорения/улучшения заживления ран при инфекции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептиды IL-22, химерные белки IL-22 Fc или агонисты IL-22 можно применять для лечения ран или стимуляции/ускорения/улучшения заживления ран при микробиологическом загрязнении или колонизации с риском инфекции. В соответствии с дополнительными

вариантами осуществления больной, нуждающийся в лечении для заживления раны, может быть больным сахарным диабетом. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления рана представляет собой диабетическую рану, например, язву диабетической стопы. В соответствии с некоторыми дополнительными вариантами осуществления рана представляет собой инфицированную диабетическую рану, например, инфицированную язву диабетической стопы.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим предлагаемые в настоящем документе полипептид IL-22, химерный белок IL-22 Fc или агонист IL-22, например, для применения в любом из описанных выше терапевтических способов. В соответствии с одним вариантом осуществления фармацевтический состав содержит предлагаемые в настоящем документе полипептид IL-22, химерный белок IL-22 Fc или агонист IL-22 и фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с другим вариантом осуществления фармацевтический состав содержит предлагаемые в настоящем документе полипептид IL-22, химерный белок IL-22 Fc или агонист IL-22 и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, которые описаны ниже.

Химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению можно применять либо отдельно, либо в комбинации с другими средствами при терапии. Например, полипептид IL-22, химерный белок IL-22 Fc или агонист IL-22 по настоящему изобретению можно одновременно применять по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммунодепрессант, который уменьшает воспалительную реакцию, включая без ограничения метотрексат, ингибитор TNF, антагонист TNF, месалазин, стероид, дексаметазон и азатиоприн и их комбинацию. Подходящими дополнительными терапевтическими средствами, которые уменьшают воспалительную реакцию, включают без ограничения 5-аминосалициловую кислоту (5-ASA), меркаптопурин (также называемый 6-меркаптопурин или 6-MP) или их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL22 или химеру IL-22 Fc можно одновременно применять с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, которые уменьшают воспалительную реакцию (например, 5-ASA, 6-MP или антагонистом TNF), для лечения IBD. В соответствии с другими определенными вариантами осуществления полипептид IL22 или химеру IL-

22 Fc можно одновременно применять с антагонистом интегрина, таким как этролизумаб, для лечения IBD. В соответствии с одним вариантом осуществления полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc применяют в комбинации с агонистом IL-22.

Для ускорения заживления хронических ран, например, для лечения язвы диабетической стопы, применение полипептида IL-22 или его фрагментов или вариантов, химерные белки IL-22 Fc или агонисты IL-22 можно комбинировать с одним или несколькими дополнительными средствами для заживления ран. Подходящие дополнительные средства для заживления ран включают без ограничения факторы роста (например, EGF, FGF, IGF, PDGF, TGF и VEGF), нейрональный ростовой фактор (NGF), факторы ангиогенеза (например, HGF, TNF-α, ангиогенин, IL-8, ангиопоэтины 1 и 2, Tie-2, интегрин α5, матричные металлопротеиназы, оксид азота, COX-2), членов семейства тромбоцитарных факторов роста (PDGF) (например, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C и PDGF-D), членов семейства инсулиноподобных факторов роста (IGF) (например, IGF-I, IGF-II), членов семейства трансформирующих факторов роста (TGF) (например, TGF-α TGF-β) и анаболический кислород (вакуумная терапия). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид IL-22 или химеру IL-22 Fc можно одновременно применять с одним или несколькими дополнительными описанными в настоящем документе средствами для заживления ран и/или одним или несколькими противобактериальными средствами или антибиотиками, подходящими для использования при местном применении. См. WO2006/138468, включенный в настоящий документ с помощью ссылки в полном его объеме. В соответствии с такими вариантами осуществления антибиотиком может быть серосодержащий антибиотик, включая без ограничения сульфадиазин серебра, т. е. сильвадин. Одновременно применяемые один или несколько дополнительных средств можно применять параллельно, попеременно или последовательно с полипептидом IL-22, химерным белком IL-22 или агонистом IL22.

В соответствии с дополнительными иллюстративными вариантами осуществления, если целью является предупреждение или лечение сердечно-сосудистых заболеваний или состояний или метаболического синдрома, то введение полипептида IL-22 или его фрагментов или вариантов, химерных белков IL-22 Fc или агонистов IL-22 можно комбинировать или дополнять введением снижающих содержание холестерина средств, таких как статины (например, ловастин,

розувастатин, флувастатин, аторвастатин, правастатин и симвастатин), связывающие желчные кислоты смолы (колестипол, холестираминсахароза и колесевелам), эзетимиб или комбинация эзетимиба и симвастатина; антитромбоцитарных средств, таких как ингибиторы циклооксигеназы (аспирин), ингибиторы аденозиндифосфатных (ADP) рецепторов (клопидогрель, прасугрел, тикагрелор, тиклопидин), инибиторы фосфодиэстеразы (цилостазол), ингибиторы гликопротеина IIB/IIIA (абциксимаб, эптифибатид, тирофибан), ингибиторы обратного захвата аденозина (дипиридамол), ингибиторы тромбоксана (ингибиторы тромбоксансинтазы, антагонисты тромбоксановых рецепторов, терутробан); бета-блокаторов, таких как альпренолол, буциндол, картеолол, карведилол, лабеталол, надолол, окспренолол, пенбутолол, пиндолол, пропранолол, соталол, тимолол, кора эвкомии, ацебутолол, атенолол, бетаксолол, бизопролол, целипролол, эсмолол, метопролол, небиволол, бутаксамин, ICI-118,551 и SR 59230A; ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ACE), таких как каптоприл, зофеноприл, дикарбоксилат-содержащие средства (эналаприл, рамиприл, хинаприл, периндоприл, лизиноприл, беназеприл, имидаприл, зофеноприл), фосфат-содержащие средства (фозиноприл), касокинины, лактокинины, лактотрипептиды (Val-Pro-Pro и Ile-Pro-Pro, вырабатываемые пробиотическим Lactobacillus helveticus, или полученный из них казеин); блокаторов кальциевых канальцев, таких как дигидропиридины (например, амлодипин, аранидипин, азелнидипин, барнидипин, бенидипин, цилнидипин, клевидипин, исрадипин, эфонидипин, фелодипин, лацидипин, лерканидипин, манидипин, никардипин, нифедипин, нилвадипин, нимодипин, нисолдипин, нитрендипин и пранидипин), фенилалкиламин (например, верапамил), бензотиазепины (например, дилтиазем), мибефрадил, бепридил, флуспирилен и фендилин; диуретиков, таких как сильно действующие потолочные/петлевые диуретики (например, фуросемид, этакриновая кислота, торасемид и буметанид), тиазиды (например, гидрохлоротиазидная кислота), ингибиторы карбоангидразы (например, ацетазоламид и метазоламид), умеренные калиевые диуретики (например, антагонисты альдостерона: спиронолактон, и блокаторы эпителиальных натриевых каналов: амилорид и триамтерен), и диуретики, которые снижают почечную экскрецию кальция, и фармацевтически приемлемых солей, кислот или производных любых из вышеперечисленных.

Для связанных с инсулином нарушений или метаболического синдрома введение полипептида IL-22 или его фрагментов или вариантов или химерного белка IL-22 Fc или агонистов IL-22 можно комбинировать с или дополнять введением различных

терапевтических средств. В случае сахарного диабета I типа (инсулин-зависимого сахарного диабета или IDDM) описанные в настоящем документе полипептид IL-22, химерный белок Fc или агонист комбинируют с одним или несколькими из регулярной инсулин-заместительной терапии (включая быстродействующий и долгодействующий инсулин), иммуносупрессивного лечения, трансплантации островков и терапии стволовыми клетками. В соответствии с одним вариантом осуществления регулярная инсулин-заместительная терапия включает без ограничения регулярный инсулин (например, хумилин Р, новолин Р), инсулин изофан (например, хумилин Н, новолин Н), инсулин лизпро (например, Humalog), инсулин аспарт (например, новолог), инсулин гларгин (например, лантус) и инсулин детемир (например, левемир). В соответствии с другими вариантами осуществления, инсулин-заместительная терапия дополнительно включает прамлинтид (Symlin).

В случае сахарного диабета II типа (инсулиннезависимого сахарного диабета или NIDDM) или метаболического синдрома описанные в настоящем документе полипептид IL-22, химерный белок Fc и агонист можно комбинировать с одним или несколькими из инсулин-заместительной терапии (которая рассмотрена выше), средство, понижающее выработку глюкозы печенью, средство, стимулирующее выработку секрета поджелудочной железы и высвобождение инсулина, средство, блокирующее ферментативное расщепление углеводов или повышающее чувствительность к инсулину. В соответствии с одним вариантом осуществления средством, понижающим выработку глюкозы, является метформин (например, Glucophage, Glumetza). В соответствии с другим вариантом осуществления средством, стимулирующим выработку секрета поджелудочной железы и высвобождение инсулина, является глипизид (например, Glucotrol, Glucotrol XL), глибурид (например, DiaBeta, Glynase) и глимепирид (например, Amaryl). В соответствии с еще одним вариантом осуществления средством, блокирующим ферментативное расщепление углеводов или повышающим чувствительность к инсулину, является пиоглитазон (например, Actos). В соответствии с другим вариантом осуществления полипептид IL-22, химерный белок Fc и агонист можно комбинировать с одним из следующих заместителей метформина: ситаглиптином (например, Januvia), саксаглиптином (например, Onglyza), репаглинидом (например, Prandin) и натеглинидом (например, Starlix), эксенатидом (например, Byetta) и лираглутидом (например, Victoza). В соответствии с другим вариантом осуществления полипептид IL-22, химерный белок

Fc и агонист можно комбинировать с гипогликемическим средством, например, сульфонилмочевинами.

В случае гестационного сахарного диабета или метаболического синдрома описанные в настоящем документе полипептид IL-22, химеру Fc и агонист комбинируют с пероральным лекарственным препаратом для контроля уровня сахара в крови. В соответствии с одним вариантом осуществления лекарственным препаратом является глибурид.

Комбинированная терапия может обеспечивать "синергию" и оказывать "синергический эффект", т. е. достигаемый эффект при совместном применении активных ингредиентов больше, чем сумма эффектов, являющихся результатом раздельного применения соединений. Синергического эффекта можно достичь, когда активные ингредиенты: (1) совместно составляют в смесь и одновременно вводят или доставляют в комбинированном составе с однократной дозировкой; (2) доставляют путем с чередованием или параллельно в виде отдельных составов; или (3) по некоторому другому режиму. При доставке в чередующейся терапии синергического эффекта можно достичь при последовательном введении или доставке соединений, например, с помощью различных инъекций в отдельных шприцах. В целом, при чередующейся терапии эффективную дозировку каждого активного ингредиента вводят последовательно, т. е. периодически, в то время как при комбинированной терапии эффективные дозировки двух или более активных ингредиентов вводят совместно.

Такие вышеупомянутые комбинированные терапии охватывают комбинированное введение (когда два или более терапевтических средств включены в один состав или в раздельные составы) и раздельное введение, в случае которого введение полипептида IL-22 или химерного белка IL-22 Fc по настоящему изобретению может происходить до введения, одновременно с введением и/или после введения дополнительного терапевтического средства или дополнительных терапевтических средств. В соответствии с одним вариантом осуществления введение химерного белка IL-22 Fc и введение дополнительного терапевтического средства происходит в пределах приблизительно одного месяца, или в пределах приблизительно одной, двух или трех недель, или в пределах приблизительно одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дней друг от друга.

Полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению (и любое дополнительное терапевтическое средство) можно применять любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное введение, местное

применение, и интраназальное введение, и, при необходимости местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование можно осуществлять любым подходящим путем, например, путем инъекций, таких как внутривенная или подкожная инъекции, в зависимости отчасти от того, является ли введение недолгим или длительным. В настоящем документе предусмотрены различные схемы дозирования, включая без ограничения однократное введение или многократные введения в различные моменты времени, струйное введение и импульсную инъекцию.

Полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению будут составлять в смесь, дозировать и вводить таким образом, чтобы это отвечало требованиям надлежащей медицинской практики. Рассматриваемые в данном контексте факторы включают конкретное подвергаемое лечению нарушение, конкретное подвергаемое лечению млекопитающее, клиническое состояние отдельного больного, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Нет необходимости в том, чтобы полипептид IL-22 или химерный белок IL-22 Fc составлять в смесь с одним или несколькими средствами, одновременно применяемыми для предупреждения или лечения рассматриваемого нарушения, но необязательно это можно сделать. Эффективное количество таких других средств зависит от количества химерного белка, присутствующего в составе, типа нарушения или лечения и других рассматриваемых выше факторов. Их обычно применяют в одинаковых дозировках и путями введения, которые описаны в настоящем документе, или в приблизительно от 1 до 99% дозировок, описанных в настоящем документе, или в любой дозировке или любым путем, которые эмпирически/клинически определены как соответствующие.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая дозировка химерного белка IL-22 Fc по настоящему изобретению (при применении отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами) будет зависеть от типа подлежащего лечению заболевания, типа Fc участка, тяжести и течения заболевания, независимо от того, вводят ли химерный белок с целью предупреждения или для терапевтических целей, предварительной терапии, истории болезни и реакции больного на химерный белок IL-22 Fc и компетенции лечащего врача. Химерный белок IL-22 Fc предпочтительно вводят больному за один раз или в течении серии лечебных процедур. В зависимости от типа и тяжести

заболевания, начальная предполагаемая дозировка для введения субъекту может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1 мг/кг - 10 мг/кг) или приблизительно 0,1 мкг/кг - 1,5 мг/кг (например, 0,01 мг/кг - 1 мг/кг) химерного белка IL-22 Fc, независимо от того, например, за одно или за несколько раздельных введений или путем непрерывной инфузии. Одна типичная суточная дозировка может варьировать от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от упомянутых ранее факторов. Для повторных введений на протяжении нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно будут продолжать до тех пор, пока не произойдет необходимое подавление симптомов заболевания. Одна иллюстративная дозировка химерного белка IL-22 Fc может находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Некоторые другие дозировки включают диапазон от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг и от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, больному можно вводить одну или несколько доз, составляющих приблизительно 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Для местного заживления ран на больном можно применять одну или несколько доз, составляющих от приблизительно 0,001 мг/см^2 до приблизительно 10мг/см^2 площади раны, от приблизительно 0,05мг/см^2 до приблизительно 5 мг/см^2 площади раны, от приблизительно 0,01 мг/см^2 до приблизительно 1мг/см^2 площади раны, от приблизительно 0,05 мг/см^2 до приблизительно 0,5 мг/см^2 площади раны, от приблизительно 0,01 мг/см^2 до приблизительно 0,5 мг/см^2 площади раны, от приблизительно 0,05 мг/см^2 до приблизительно 0,2 мг/см^2 площади раны или от приблизительно 0,1 мг/см^2 до приблизительно 0,5 мг/см^2 площади раны (или любую их комбинацию). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления на больном можно применять одну или несколько доз, составляющих приблизительно 0,01 мг/см^2, 0,02 мг/см^2, 0,03 мг/см^2, 0,04 мг/см^2, 0,05 мг/см^2, 0,06 мг/см^2, 0,07 мг/см^2, 0.08 мг/см^2, 0,09 мг/см^2, 0,1 мг/см^2, 0,15 мг/см^2, 0,2 мг/см^2, 0,25 мг/см^2, 0,3 мг/см^2, 0,4 мг/см^2 или 0,5 мг/см^2 площади раны. Такие дозы можно вводить с промежутками, например, раз в неделю, раз в две недели или раз в три недели (например, так, чтобы больной получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шесть доз химерного белка IL-22 Fc). Можно вводить начальную более высокую

ударную дозу с последующим введением одной или нескольких более низких доз. Тем не менее, пригодными могут быть другие режимы дозирования. Прогресс такой терапии легко отслеживать при помощи традиционных методик и анализов. Схожие диапазоны дозировок можно применять и к полипептиду IL-22.

Понятно, что любой из описанных выше составов или терапевтических способов можно осуществить с помощью конъюгата по настоящему изобретению вместо химерного белка IL-22 Fc или в дополнение к нему.

J. Изделия

В соответствии с другим аспектом по настоящему изобретению настоящее изобретение относится к изделию, содержащему материалы, пригодные для лечения, предупреждения и/или диагностики описанных выше нарушений. Изделие включает емкость и этикетку или листок-вкладыш на емкости или ассоциированные с емкостью. Подходящие емкости включают, например, бутыли, ампулы, шприцы, пакет для растворов для внутривенного вливания и т. д. Емкости могут быть сформированы из ряда материалов, таких как стекло или пластик. Емкости содержат композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностики состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, емкость может представлять собой пакет для раствора для внутривенного вливания или ампулу с пробкой, которую можно проколоть иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере одним активным средством в композиции является химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению. На этикетке или листке-вкладыше указано, что композицию применяют для лечения предпочтительного состояния. Более того, изделие может включать (a) первую емкость с содержащейся в ней композицией, причем композиция содержит химерный белок IL-22 Fc по настоящему изобретению; и (b) вторую емкость с содержащейся в ней композицией, причем композиция содержит дополнительно цитотоксическое или действующее иным образом терапевтическое средство. Изделие в соответствии с таким вариантом осуществления по настоящему изобретению может дополнительно содержать листок-вкладыш, на котором указано, что композиции можно применять для лечения конкретного состояния. Альтернативно или дополнительно, изделие может дополнительно включать вторую (или третью) емкость, содержащую фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может

дополнительно включать другие материалы, необходимые с коммерческой или потребительской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Понятно, что любое из описанных выше изделий может включать конъюгат по настоящему изобретению вместо химерного белка IL-22 Fc или в дополнение к нему.

K. Скрининговые анализы и животные модели

Как проиллюстрировано в разделе Примеры, IL-22, химерный белок IL-22 Fc и агонисты IL-22 можно оценить в ряде клеточных анализов и животных моделях IBD, сердечно-сосудистых заболеваний или состояний и метаболического синдрома.

Рекомбинантные (трансгенные) животные модели можно сконструировать путем введения кодирующей части представляющих интерес генов в геном представляющих интерес животных с помощью стандартных методик получения трансгенных животных. Животные, которые могут служить объектом для трансгенной манипуляции, включают без ограничения мышей, крыс, кроликов, морских свинок, овец, коз, свиней и приматов, за исключением человека, например, павианов, шимпанзе и других обезьян. Известные из уровня техники методики введения трансгена таким животным включают микроинъекцию в пронуклеус (Hoppe and Wanger, патент США № 4873191); опосредованный ретровирусом перенос генов в зародышевые линии (например, Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); направленное воздействие на ген у эмбриональных стволовых клеток (Thompson et al., Cell 56, 313-321 [1989]); электропорацию зародышей (Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814 [1983]); спермий-опосредованный перенос генов (Lavitrano et al., Cell 57, 717-73 [1989]). Обзор, см., например, в патенте США № 4736866.

В контексте настоящего изобретения трансгенные животные включают животных, которые несут трансген только в части своих клеток ("мозаичные животные"). Трансген можно встроить либо в качестве одного трансгена или в конкатемерах, например, в тандемах "голова к голове" или "голова к хвосту". Избирательное введение трансгена в конкретный тип клеток также можно осуществить с помощью, например, методики, описанной в Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 623-636 (1992).

Экспрессию трансгена у трансгенных животных можно отслеживать с помощью стандартных методик. Например, для проверки встраивания трансгена можно применять саузерн-блоттинг или ПЦР-амплификацию. Затем можно проанализировать

уровень экспрессии иРНК с помощью таких методик, как гибридизация in situ, нозерн-блоттинг, ПЦР или иммуноцитометрия.

Животных можно дополнительно исследовать в отношении объективных признаков соответствующей патологии, такой как патология сердечно-сосудистого заболевания, например, с помощью гистологического исследования и/или визуализации или с помощью ультразвукового анализа для определения объема атеросклеротических бляшек и функции сосудов (см. Примеры ниже). Также можно провести эксперименты с блокадой, в которых трансгенных животных обрабатывают IL-22, химерным белком IL-22 Fc или предполагаемым агонистом для определения масштабов эффектов на формирование атеросклеротических бляшек, в том числе размер, количество и степень формирования бляшек. В таких экспериментах животному вводят блокирующие антитела, которые связываются с полипептидом по настоящему изобретению, и отслеживают представляющий интерес биологический эффект.

Альтернативно, можно сконструировать "нокаутных" животных, которые имеют дефектный или измененный ген, кодирующий IL-22, в результате гомологичной рекомбинации между эндогенным геном, кодирующим полипептид IL-22, и измененной геномной ДНК, кодирующей такой же полипептид, который введен в эмбриональную клетку животного. Например, для клонирования геномной ДНК, кодирующей IL-22, можно применять кДНК, кодирующую IL-22, в соответствии с общепринятыми методиками. Часть геномной ДНК, кодирующей IL-22, можно удалить или заменить другим геном, таким как ген, кодирующий селектируемый маркер, который можно использовать для отслеживания встраивания. Как правило, в вектор включены несколько тысяч оснований неизменной фланкирующей ДНК (на обоих 5' и 3' концах) [см., например, Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987) для описания векторов для гомологичной рекомбинации]. Вектор вводят в линию эмбриональных стволовых клеток (например, при помощи электропорации) и отбирают клетки, в которых введенная ДНК гомологично рекомбинировала с эндогенной ДНК [см., например, Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. Отобранные клетки затем вводят в бластоцисту животного (например, мыши или крысы) для формирования агрегационных химер [см., например, Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Химерные зародыши затем имплантируют в подходящую псевдобеременную суррогатную самку животного и зародыш в результате развивается в "нокаутное" животное. Потомство, несущее подвергнутую гомологичной рекомбинации ДНК в своих зародышевых клетках, можно

выявить при помощи стандартных методик и использовать для разведения животных, у которых все клетки животного содержат подвергнутую гомологичной рекомбинации ДНК. Нокаутных животных можно охарактеризовать, например, по их способности противостоять определенным патологическим состояниям и по развитию у них патологических состояний в связи с отсутствием полипептида IL-22.

Таким образом, биологическую активность IL-22 или его потенциальных агонистов можно дополнительно исследования на нокаутных по мышиному IL-22 мышах.

Полагают, что приведенное далее письменное описание является достаточным для того, чтобы специалист в настоящей области техники смог осуществить на практике настоящее изобретение. Приведенные далее примеры предложены лишь в иллюстративных целях и не подразумеваются как каким-либо образом ограничивающие объем настоящего изобретения. Фактически, из приведенного выше описания специалистам в настоящей области техники будут очевидны различные модификации настоящего изобретения, помимо показанных и описанных в настоящем документе, и все они подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Далее приведены примеры способов и композиций по настоящему изобретению. Понятно, что, принимая во внимание приведенное выше общее описание, на практике можно реализовать различные другие варианты осуществления, и подразумевается, что примеры не ограничивают объем формулы изобретения.

Пример 1

Клонирование, экспрессия и очистка химерного белка IL-22 Fc

В приведенных далее экспериментах можно применять общепринятые методики молекулярного клонирования и очистки белков.

i. Клонирование

Полноразмерный человеческий IL-22 клонировали из библиотеки кДНК толстой кишки человека (Genentech). Для такого эксперимента создавали конструкции, экспрессировавшие гибридный белок человеческий IgG1 или IgG4 IL-22Fc, с помощью методики ПЦР с перекрывающимися праймерами с применением следующих праймеров: прямой праймер для IgG1 гибрида с IL-22Fc:

TTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC TGGAGTACATTCAGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGC (SEQ ID NO:52),

обратный праймер для IgG1 гибрида с IL-22 Fc: AGGTCGACTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:53), прямой праймер для IgG4 гибрида с IL-22 Fc: TTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC TGGAGTACATTCAGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGC (SEQ ID NO:54),

обратный праймер IgG4 гибрида с IL-22 Fc: AGGTCGACTTATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:55). ПЦР-продукты клонировали в векторы экспрессии pRK5.sm (Genentech). Лидерную последовательность (или сигнальный пептид) отщепляли в клетке, и зрелый гибрид IL-22 Fc не содержал лидерную последовательность. Клоны, которые несли искусственные линкеры, клонировали с праймерами, содержавшими линкерные последовательности. Дополнительно вводили мутацию N297G посредством мутагенеза с помощью ПЦР с применением следующих праймеров: прямой праймер IgG1 N297G: GCG GGA GGA GCA GTA CGG AAG CAC GTA CCG TGT GG (SEQ ID NO:56), обратный праймер IgG1 N297G: CCA CAC GGT ACG TGC TTC CGT ACT GCT CCT CCC GC (SEQ ID NO:57), прямой праймер IgG4 N297G: ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC GGA AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC (SEQ ID NO:58), и обратный праймер IgG4 N297G: GAC GCT GAC CAC ACG GTA CGT GCT TCC GAA CTG CTC CTC CCG CGG CTT TGT (SEQ ID NO:59). Последовательности всех конструкций IL-22Fc подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

ii. *Культивирование клеток*

Клетки CHO выращивали в суспензии с разделением культур 2 раза в неделю на 0,3 x 10^6клетки/мл в инкубаторе, установленном на 37°C и 5%CO_2.

iii. *Трансфекция химерного белка IL-22 Fc в клетки CHO и экспрессия белка*

Клетки CHO высевали в количестве 1,23 x 10^6 клеток/мл в 720 мл культуральной среды. Трансфекционный комплекс (1,6 мл PEI + 800 мкг ДНК в 80 мл бессывороточной среды) инкубировали в течение 10 минут перед добавлением к клеткам. Культуру инкубировали при 33°C, 5% CO_2, в течение 24 часов. После дополнительного культивирования в течение 14 дней надосадочную жидкость культуры собирали при помощи центрифугирования. Переходную CHO-

кондиционированную среду (надосадочную жидкость с верхней фракции) очищали при помощи колонки для аффинной хроматографии с белком A MabSelect Sure (GE Healthcare). Элюат с низким pH нейтрализовали до pH 5,0 и дополнительно очищали с помощью гельфильтрационной колонки (GE Healthcare). Элюированный пик объединяли, составляли в смесь и подвергали стерилизующей фильтрации. Статус гликозилирования Fc-участка химерного белка анализировали с помощью масс-спектрометрии, как рассмотрено ниже.

iv. *Формирование стабильных клонов, экспрессировавших химерный белок IL-22 Fc*

Плазмиду, кодировавшую химерный белок IL-22 Fc, вводили в клетки CHO путем трансфекции с применением липофектамина Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen). После трансфекции клетки центрифугировали и повторно высевали в бессывороточную селективную среду. Отбирали изоляты для секреции IL-22 Fc. Клоны с наивысшим титром, который был выявлен с помощью ELISA, затем объединяли и масштабировали для получения продукта.

v. *Экспрессия химерного белка IL-22 Fc в E. coli*

Ферментированное *E. coli* сырье гомогенизировали и кондиционировали до 0,4% вес/вес PEI, pH 6,7, и центрифугировали. Фугат очищали с помощью колонки для аффинной хроматографии с белком A MabSelect Sure (GE Healthcare). Элюат с низким pH нейтрализовали до pH 5,0 и дополнительно очищали с помощью ионообменной хроматографии. Фракции объединяли, составляли в смесь и подвергали стерилизующей фильтрации.

Пример 2

У химерного белка IL-22 Fc наблюдали высокий процент афукозилирования в Fc-участке

В этом исследовании изучали статус гликозилирования Fc-части химерных белков IL-22 Fc. Образцы очищенных химерных белков IL-22 Fc из временно трансфицированных клеток расщепляли при помощи трипсина (1:25 трипсин: IL-22 Fc, вес/вес) в течение 2 часов при 37°C. Образцы подкисляли при помощи трифторуксусной кислоты до конечной концентрации 0,1% и вводили инъекцией в нагретую колонку C18 (PLRP-S, 1000A 8 мкм, Agilent), уравновешенную при помощи

0,05% TFA в воде. Продукты расщепления разделяли при помощи линейного градиента ацетонитрила (5-60%) на протяжении 20-минутного периода времени. Колонку непосредственно соединяли с отверстием электрораспылителя TOF масс-спектрометра Agilent 6520B и определяли массы элюированных фракций в режиме определения положительных ионов. Поскольку Fc-части этих химерных конструкций были стабильны в растворе трипсина при таких условиях расщепления, то можно было проводить непосредственное сравнение углеводородного статуса различных химер IL-22.

Как показано на фигуре 2, как у химерных белков IL-22 IgG1, так и у химерных белков IgG4 Fc наблюдали аномально высокие уровни афукозилирования. Расчетные массы для гликозилированного Fc типичного моноклонального антитела IgG1 были массами, которые были отмечены как 53296, 53458 и 53620 Да на секции A фигуры 2. Как правило, каждый основной углеводный компонент на каждом плече Fc имел следующей углеводной состав: 4 N-ацетилглюкозаминных, 3 маннозных сахара и 1 фукозный сахар (которые на пике отмечены 53296 в секции A). Добавление одного или двух галактозных сахаров давало пики, отмеченные 53458 и 53620 Да, соответственно (секция A). Детектировали незначительно количество молекул, содержавших сахарные фрагменты, у которых отсутствовала фукоза на одном плече Fc (“-1 фукоза”).

К удивлению, у всех химерных белков человеческий IL-22 IgG1 Fc с различными конструкциями, в которых домен CH2 был гликозилированным, наблюдали высокий уровень афукозилирования, в том числе сахарные фрагменты без глюкозы на одном плече (“-1 фукоза”) и на обоих плечах Fc (“-2 фукозы”). См. фигуру 2, секции B-D. Такие афукозилированные молекулы составляли до приблизительно 30% общего числа наблюдаемых компонентов. Афукозилирование могло повышать нежелательные эффекторные активности химер IL-22 IgG1 Fc.

Известно, что IgG4 обладает меньшей эффекторной функцией по сравнению с IgG1. Неожиданностью стало, что результаты масс-спектрометрического анализа также показывали “-1 фукоза” и “-2 фукозы” гликозилированные компоненты в расщепленных трипсином Fc-участках химерного белка человеческий IL-22 IgG4 Fc. Такие афукозилированные молекулы составляли более 50% от общего числа наблюдаемых компонентов. Фигура 2, секция E. Афукозилированные антитела имели намного большие ADCC или CDC цитотоксические активности, свойство, которое не желательно для таких химерных белков IL-22 Fc.

Соответственно, конструировали две дополнительные молекулы IL-22 Fc, одна, содержавшая IgG1 Fc, а другая IgG4 Fc, в которых остаток в Fc, который в норме гликозилирован (N297), мутировали в глицин (N297G), таким образом предупреждая прикрепление сахара к основному компоненту. Было показано, что они были лишены каких-либо сахаров на своих Fc-частях, и оба характеризовались своими расчетными молекулярными массами Fc, исходя из их аминокислотных последовательностей (фигура 2, секции F и G).

В заключение, у Fc-участка химерных белков человеческий IL-22 Fc, химеры с Fc либо IgG1, либо IgG4, наблюдали высокие уровни афукозилирования, которые могли в результате давать повышенные ADCC или CDC активности, свойство, которое нежелательно при применении в качестве терапевтических средств на основе IL-22. Поэтому, в последующих исследованиях тестировали негликозилированные варианты.

Пример 3

Анализ активности *in vitro* химерного белка IL-22 IgG1 и IgG4 Fc

IL-22 взаимодействует с рецепторным комплексом IL-22 и активирует сигнальный путь Jak-Stat. Активация STAT3 является основным событием в IL-22-опосредованном сигнальном пути. В этом эксперименте измеряли in vitro активности химерных белков IL-22 Fc с помощью анализа репортерного гена люциферазы. Конструировали клетки HEK 293, сверхэкспрессировавшие человеческий рецепторный комплекс IL22, IL22R1 и IL10R2. На день 1 высевали $1x10^5$ клеток 293 в 24-луночные планшеты в 0,4 мл модифицированной по Дульбекко среды Игла (DMEM) + 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). На день 2 клетки трансфицировали посредством репортера люциферазы под управлением STAT3 и контроля, представлявшего собой люциферазу Renilla, с применением липофектамина Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в 0,1 мл среды с пониженным содержанием сыворотки крови (Gibco Poti-MEM с пониженным содержанием сыворотки крови, которое было снижено по меньшей мере на 50%). Репортерная конструкция люциферазы под управлением STAT3 содержала STAT3-восприимчивую репортерную конструкцию люциферазы, содержавшую тандемные повторы sis-индуцируемого элемента (SIE) и репортерный ген люциферазы светлячка. На день 3 химерные белки IL-22 Fc, вырабатываемые либо временными, либо устойчивыми клонами CHO, покапельно добавляли в различных концентрациях в 0,5 мл среды и добавляли поверх трансфицированных клеток. На день 4 среды удаляли и клетки лизировали при помощи 100 мкл буфера для пассивного лизиса

(поставляемого в аналитической системе Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System). Двенадцать микролитров клеточных лизатов переносили в 96-луночный планшет и анализировали при помощи аналитической системы Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System на люминометре (Promega). EC50 рассчитывали на основе дозозависимой активности в программном обеспечении GraphPad Prism (Ла-Хойя, Калифорния). Значения EC50 для различных химерных конструкций IL-22 Fc показаны в приведенной ниже таблице 2.

Таблица 2

Конструкция IL-22 Fc	**Изотип Fc**	**Линкер**	**Выработка**	**EC50 (пМ)**
1	huIgG1	DKTHT (SEQ ID NO:32)	CHO	150-200
2	huIgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33)	CHO	350-500
3	huIgG1	VEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:34)	CHO	100-150
4	huIgG1	KVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:35)	CHO	50-75
5	huIgG1	KKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:36)	CHO	25-50
6	huIgG1	DKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:37)	CHO	25-50
7	huIgG1	VDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:38)	CHO	25-50
8	huIgG1	KVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39)	CHO	2,5-5
9	huIgG1	GGGDKTHT (SEQ ID NO:41)	CHO	50-75
10	huIgG1	GGGSTHT (SEQ ID NO:63)	CHO	50-100
11	huIgG1	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)	CHO	50-100
12	huIgG1	DKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:64)	CHO	25
13	huIgG1	KVDKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:65)	CHO	25

14	huIgG1	DKTHT (SEQ ID NO:32) N297A	CHO	150-200
15	huIgG1	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40) N297A	CHO	50-100
16	huIgG1	DKTHT (SEQ ID NO:32) (N297G)	CHO	150-200
17	huIgG1	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40) (N297G)	CHO	50-100
18	huIgG1	KKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:66) (N297G)	CHO	20
19	huIgG4	SKYGPP (SEQ ID NO:43)	CHO	150-200
20	huIgG4	SKYGPP (SEQ ID NO:43) N297G	CHO	75-100
21	huIgG4	RVESKYGPP (SEQ ID NO:44)	CHO	25-50
22	huIgG4	RVESKYGPP (SEQ ID NO:44) N297G	CHO	50-75
23	huIgG1	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:42) (линкер IgG3)	CHO	50-75
24	huIgG1	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)	E. coli	16
25	huIgG1-мономерный IL-22	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)	E. coli	82

Конструировали большое количество химерных белков IL-22 Fc с линкерами с различной длиной и последовательностями для исследования активностей, устойчивости и выхода каждой конфигурации. Линкеры с нативными последовательностями IgG предпочтительны для минимизации потенциального риска иммуногенности; тем не менее, линкеры настоящим изобретением учитываются и охватываются экзогенные последовательности, у которых наблюдали хорошую *in vitro* активность.

Химерный белок IL-22 IgG1 Fc, содержавший линкер DKTHT (SEQ ID NO:32), тестировали в STAT3-люциферазном анализе. См. таблицу 2. Для уменьшения EC50

химерного белка длину линкера увеличивали с 5 до 10 аминокислот, составлявших нативную последовательность IgG1 EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33). У полученного химерного белка IL-22 Fc, тем не менее, наблюдали сниженную *in vitro* активность. См. таблицу 2. К удивлению, увеличение длины линкера даже на одну аминокислоту VEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:34) повышало активность химерного белка IL-22. Дополнительные увеличения длины линкера давали в результате дополнительное повышение активности. См. таблицу 2.

В отдельных экспериментах, Cys в EPKSCDKTHT заменяли на Ser для устранения возможности образования дисульфидной связи. Как показано в таблице 2, у химеры IL-22 Fc с линкером EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40) наблюдали повышенную активность по сравнению с исходной линкерной последовательностью с остатком Cys. Более длинная линкерная последовательность, встраивавшая предшествующие последовательности (в домен CH1 у IgG1), дополнительно повышала активность. У конструкции с мутацией N297G наблюдали схожие значения EC50 при сравнении с аналогами дикого типа. Для дальнейших исследований были выбраны химерный белок IL-22 IgG1 (N297G) Fc (SQE ID NO:12) и химерный белок IL-22 IgG4 (N297G) Fc (SEQ ID NO:8).

In vitro активности химерного белка человеческий IL-22 IgG1 (N297G) Fc (SQE ID NO:12) или химерного белка IL-22 IgG4 (N297G) Fc (SEQ ID NO:8), экспрессированных стабильными клонами, тестировали в аналогичном анализе. Данные на фигуре 4 демонстрируют представительные результаты. Как химерный белок IL-22 IgG1 Fc, так и химерный белок IL-22 IgG4 Fc индуцировали STAT3-активность зависимым от дозы образом. У обоих химерных белков IL-22 Fc наблюдали схожую эффективность. У химерных белков IL-22 Fc, экспрессировавшихся во временно трансфицированных клетках, наблюдали схожие результаты (данные не показаны). В качестве контроля в таком же анализе тестировали нативный белок IL-22, продуцируемый клетками CHO, и наблюдали у него в два - три раза более высокую эффективность, чем у химерных белков IL-22 Fc.

В заключение, как у химерных белков IgG1 IL-22 Fc, так и у химерных белков IgG4 IL-22 Fc наблюдали *in vitro* активность, которая была продемонстрирована с помощью STAT3-люциферазного анализа. Кроме того, было показано, что химерные белки IL-22 Fc с линкерами с различной длиной и последовательностями активировали IL-22R-опосредованную люциферазную активность.

Пример 4

Химерные белки IL-22 Fc уменьшали симптомы DSS-индуцированного колита у мышей

Индуцированный декстраном сульфта натрия (DSS) колит является общепринятой мышиной моделью колита. Пероральное введение содержащей DSS воды быстро повреждает эпителиальные клетки толстой кишки и вызывает существенную потерю массы тела и разрушение эпителиальной структуры толстой кишки, характеризуемое либо иммуногистохимическим (IHC) окрашиванием, либо клинической оценкой гистологии, проводимой патоморфологом. В таком исследовании обоснованности концепции испытывали влияние химерного белка IL-22 Fc на DSS-индуцированный колит.

У мышей C57BL/6 колит индуцировали при помощи питьевой воды, содержавшей 3,5% DSS, в течение пяти последовательных дней, начиная с дня 0. Вводили дозу белка мышиный IL-22 IgG2a Fc (SEQ ID NO:60), заменителя для химерного белка человеческий IL-22 Fc, внутрибрюшинным путем в количестве 5 мг/кг в день -1, 1, 4 и 6. Ежедневно измеряли массу тела животных. На день 8 всех животных умерщвляли и исследовали гистологию толстой кишки как с помощью IHC-окрашивания, так и с помощью гистологической оценки вручную.

Как показано на фигуре 5, DSS-индуцированный колит ассоциирован с резкой потерей массы тела (фигура 5A), повреждением эпителия толстой кишки и воспалением толстой кишки (фигура 5B) и высоким баллом при оценке гистологии (фигура 5C). Обработка с помощью IL-22Fc значимо предупреждала потерю массы, восстанавливала целостность эпителия, ослабляла воспаление и уменьшала балл при оценке гистологии. См. фигуру 5. Эффективность IL-22 Fc превышала эффект дексаметазона, стероидного стандарта лечения (SOC), который вызывал существенную потерю массы тела в настоящем исследовании.

Пример 5

Фармакокинетическое исследование химерного белка IL-22 Fc

Предварительное исследование безопасности и PKPD на яванских макаках было одобрено Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC). Исследование проводили в Charles River Laboratories (CRL), Preclinical Services (Рино, Невада). В общей сумме 15 самцов яванского макака (4-5 кг) из имеющихся в наличии у CRL случайно распределяли на пять групп (n = 3/группа).

Животным в группе 1 давали внутривенную (i.v.) дозу контрольного наполнителя в дни 1 и 8. Животным в группах 2 и 3 давали однократную i.v. болюсную дозу IL22-Fc IgG1 в количестве 0,15 и 1,5 мг/кг, соответственно, в дни 1 и 8. Животным в группах 4 и 5 давали однократную i.v. болюсную дозу IL22-Fc IgG4 в количестве 0,15 и 1,5 мг/кг, соответственно, в дни 1 и 8. Собирали образцы сыворотки в различные моменты времени для PK и PD анализа от начального момента до дня 43 и оценивали концентрации IL22-Fc с помощью ELISA.

Для анализа человеческого IL-22-Fc в сыворотке яванского макака применяли мышиные mAb к человеческому IL-22 (Genentech) в качестве антитела захвата в анализе ELISA. Для построения стандартной кривой использовали рекомбинантный химерный белок IL-22 Fc. Связавшийся с планшетом IL-22-Fc детектировали в ходе 1-часовой инкубации с HRP-конъюгированным мультиспецифичным мышиным mAb к человеческому Fcγ (Genentech), разведенном до 500 нг/мл в буфере для разведения проб. После конечного промывания добавляли тетраметилбензидиновый субстрат для пероксидазы (Moss, Inc., Pasadena, MD), давали проявиться цвету в течение 15 минут и останавливали реакцию с помощью 1 М фосфорной кислоты. Планшеты считывали на 450 нм с 620 нм эталонным фильтром с помощью считывающего устройства для микропланшетов. Концентрации химеры IL-22 Fc рассчитывали, исходя из четырех-параметрического сглаживания стандартной кривой химеры IL-22 Fc.

Для расчета PK-данных, день исследования 1 преобразовывали в PK-день 0, указывавший на начало введения дозы. Все моменты времени после прижизненного дня введения дозы рассчитывали как день исследования минус 1. Данные по концентрации в сыворотке крови для каждого животного анализировали с помощью 2-компартментного анализа с применением WinNonlin®, версии 5.2.1 (Pharsight; Маунтин-Вью, Калифорния).

Концентрации в плазме IL22-Fc демонстрировали биэкспоненциальное снижение после i.v. введения дозы (0,15 мг/кг и 1,5 мг/кг) с короткой фазой распределения и длинной конечной фазой выведения. См. фигуру 6. Двухкомпартментную модель с линейным выведением IL-22 Fc из центрального компартмента хорошо описывала фармакокинетические профили для обеих доз, свидетельствуя о несущественном мишень-опосредованном распределении в таких диапазонах доз.

Максимальная концентрация в сыворотке ($C_{макс}$) и площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени (AUC), рассчитанные с помощью двухкомпартментного анализа, были примерно линейными и дозопропорциональными.

См. таблицу 3. Дозопропорциональная кинетика свидетельствовала о насыщении IL-22R с тестируемыми дозами. Как показано на фигуре 6, для химер IL-22 IgG4 Fc, к удивлению, наблюдали в 2 раза более медленный CL и более чем в 2 раза более высокую концентрацию по сравнению с химерой IgG1 Fc. Без ограничения конкретными механизмами, более быстрый клиренс (CL) химеры IgG1 мог быть связан с меньшей устойчивостью химерной конструкции IgG1, поскольку более чем в 2 раза более быстрый CL химеры IL-22 IgG1 Fc, по-видимому, в основном был обусловлен большим объемом распределения. Бета периоды полувыведения, составлявшие 4-5 дней, были сходными у химер IgG1 и IgG4.

Таблица 3

Группа	**AUC (день • мкг/мл)**	**$C_{макс}$ (мкг/мл)**	**CL (мл/день/кг)**	**Бета_HL* (день)**
0,15 мг/кг IgG1	4,47 ± 0,603	2,70 ± 0,607	34,0 ± 4,26	4,02 ± 0,478
1,5 мг/кг IgG1	51,1 ± 9,70	30,5 ± 4,14	30,1 ± 6,18	5,33 ± 0,580
0,15 мг/кг IgG4	11,3 ± 0,752	3,99 ± 0,432	13,3 ± 0,853	4,61 ± 0,394
1,5 мг/кг IgG4	102 ± 18,9	33,4 ± 4,02	15,0 ± 2,58	5,80 ± 0,770

*Бета период полувыведения

Пример 6

Оценка *in vivo* активности IL-22Fc у яванского макака

Яванским макакам (*Macaca fascicularis*) внутривенно вводили дозу химеры IL-22 Fc с изотипом IgG1 или IgG4, как было указано, с дозами, составлявшими 0,15 мг/кг или 1,5 мг/кг. IL-22, связывающийся с рецептором IL-22, запускает экспрессию нескольких генов, в том числе сывороточного амилоида A (SAA), RegIII/панкреатит-ассоциированного белка (PAP, также называемого PancrePAP) и липополисахарид-связывающего белка (LPS-BP). В настоящем исследовании *in vivo* активности химерного белка IL-22 Fc анализировали путем измерения экспрессии SAA, PancrePAP и LPS-BP. Получали образцы сыворотки на протяжении периода времени до и после введения дозы как показано на графике. Уровни циркулирующего в крови SAA мартышки количественно оценивали в сыворотке крови с применением коммерческого набора для проведения твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) (каталож.

№ 3400-2), который можно приобрести у Life Diagnostics (Вест Честер, Пенсильвания). Уровни циркулирующего в крови RegIII/PAP количественно оценивали в сыворотке крови с применением коммерческого набора для проведения ELISA (каталож. PancrePAP), выпускаемого компанией Dynabio (Марсель, Франция).

Уровни липопротеин-связывающего белка (LBP) в образцах сыворотки крови определяли с применением надлежащего ELISA. Биотинилированный липопротеин (Enzo Life Sciences, Фармингдейл, Нью-Йорк) наносили на покрытый стрептавидином титрационный микропланшет (Thermo; Рокленд, Иллинойс). Рекомбинантный человеческий LBP (R&D Systems, Inc., Миннеаполис, Миннесота) применяли в анализах в качестве стандарта. Аналит связавшегося LBP детектировали с помощью мышиного моноклонального антитела к LBP (Thermo, Рокленд, Иллинойс). Для детекции применяли Fc с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP)-F(ab')$_2$ фрагментом козы к –мышиным IgG (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания). Колориметрические сигналы визуализировали после добавления 3,3′,5,5′-тетраметилбензидинового (TMB) субстрата (Kirkegaard & Perry Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд). Реакцию останавливали путем добавления 1 М фосфорной кислоты измеряли поглощение на 450 нм с применением 650 нм эталонного фильтра на считывающем устройстве для планшетов. (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Со всеми образцами для ELISA проводили анализ согласно указаниям производителя и их готовили либо в однократном разведении в двух повторностях, либо в четырех последовательных разведениях в одной повторности, а интерполировали относительно стандартной кривой. Регистрировали среднее значение для каждого образца.

Как показано на фигуре 7, уровни белков SAA, LPS-BP и RegIII/PAP в сыворотке крови индуцировали с помощью IL-22Fc *in vivo*. У отличных от человека приматов наблюдали *in vivo* дозозависимые ответы, что указывало на взаимодействие с IL-22R и свидетельствовало о насыщении посредством IL-22Fc. В большинстве случаев, не наблюдали повышение уровней белка в сыворотке через 24 часа после второй дозы, что свидетельствовало о том, что сывороточными белками SAA, LPS-BP и RegIII/PAP были достигнуты максимальные уровни. Уровни всех трех белков в сыворотке крови медленно снижались на протяжении 35-дневного периода восстановления, возвращаясь к исходному уровню у большинства животных. При этом исключением были уровни RegIII/PAP в группе высокой дозы IgG4, которые, по-видимому, оставались повышенными на протяжении 42-дневного курса. Это могло отражать улучшенную PK

и повышенную концентрацию по AUC для химерного белка IL-22 IgG4 Fc по сравнению с химерным белком IL-22 IgG1 Fc.

Пример 7 – Обработка посредством IL-22 склонных к развитию атеросклероза мышей (Ldlr-/-Apobec1-/-)

Недавние исследования выявили роль IL-22 в иммунной защите от патогенных микроорганизмов. Его благоприятные эффекты на гомеостаз ткани со слизистой оболочкой и иммунитет натолкнул авторов на идею, что обработка IL-22 могла уменьшать эндотоксикоз и его патологические последствия, включая атерогенную дислипидемию, системное воспаление и чрезвычайное замедление прогрессирования атеросклеротической болезни и связанных с ней нарушений, в том числе сахарного диабета.

Для проверки этой гипотезы склонных к развитию атеросклероза мышей (Ldlr-/-Apobec1-/-) лечили при помощи конструкции IL-22-Fc. У этих мышей отсутствовал рецептор LDL и синтез исключительно apoB100. Эта модель уникальна в том, что она повторяет основную часть патофизиологии, ассоциированной с наследственной гиперхолестеринемией у человека. В частности, на кормовом рационе у этих мышей развивались повышенный LDL холестерин, липидный профиль с распределением холестерина, схожим с распределением у людей, и прогрессивное образование бляшек. Кроме того, Ldlr-/-Apobec-/- мыши обладали измеряемыми факторами риска, которые способствовали развитию у них сердечно-сосудистого заболевания, в том числе резистентности к инсулину, системного воспаления, прогрессивное развитие бляшек и дисфункции эндотелиальных клеток. В этом случае мы демонстрировали, что 3 месяца обработки химерным белком IL-22-Fc могли значительно улучшить здоровье сердечно-сосудистой системы у этих животных и уменьшить прогрессирование атеросклероза.

Материал и способы

Мышиные конструкции IL-22-Fc. Применяемые в настоящем изобретении конструкция и полипептид IL-22-Fc, как правило, представляли собой химерный белок IL-22-мышиный-Fc (SEQ ID NO:73), который показан на фигуре 32A (и кодирующая его последовательность ДНК, которая показана на фигуре 32B, SEQ ID NO:72). Белок получали в клетках CHO в результате временных трансфекций плазмидной ДНК. Химерный белок очищали путем прогона клеточной надосадочной жидкости через колонку с белком A с последующей ионообменной хроматографией для устранения

агрегатов. Период полужизни в сыворотке крови оценивали путем введения инъекцией одной дозы 10 мг/кг IL-22-Fc в мышь C57B6 с последующим получением от мыши сыворотки крови через заданные временные интервалы. Уровни IL-22-Fc в сыворотке крови определяли при помощи "сэндвич" ELISA с применением mAb к IL-22. Для исследований in vivo с применением мышей с двойным нокаутом Lrlr-/-Apobec1-/- использовали конструкцию мышиного IL-22-Fc. Несмотря на то, что присутствовали и были использованы мышиные последовательности, ожидали, что в различных вариантах осуществления мышиные последовательности можно заменить человеческими последовательностями.

Исследования на мышах. Мышей с двойным КО Ldlr-/-Apobec1-/- разводили в лаборатории по разведению животных Genentech, а мышей WT C57BL/6 приобретали у Jackson Laboratory. Мышей содержали в стерильном виварии при 21°C при стандартном цикле 12 часов день/12 часов ночь с доступом к корму: стандартному корму для грызунов (Labdiet 5010, 12,7% калорий из жира) или рациону с высоким содержанием жиров и высоким содержанием углевода (Harlan Teklad TD.03584, 58,4% калорий из жира) и воде без ограничений. db/db мыши на фоне C57BLKS/J были самками, а все остальные использованные в этом исследовании мыши были самцами. Мышиный IL-22-Fc или контрольное антитело IgG вводили внутрибрюшинным (ip) путем, начиная с возраста 6 месяцев в количестве 50 мкг/неделя в течение трех месяцев (всего 12 недельных доз).

Анализ объема атеросклеротических бляшек. Рентгеноскопическую компьютерную микротомографию высокого разрешения применяли для количественной оценки объема атеросклеротического повреждения и состава атеросклеротических бляшек. Животных умерщвляли посредством ингаляции диоксидом углерода, затем перфузировали через левый желудочек сердца десятью миллилитрами фосфатно-солевого буферного раствора, затем десятью миллилитрами десятипроцентного нейтрального забуференного формалина. Аорты иссекали и погружали в десятипроцентный нейтральный забуференный формалин минимум на двадцать четыре часа и переносили в раствор двадцатипроцентного йодного рентгеноконтрастного средства, Isovue 370 (Bracco Diagnostics Inc., Принстон, Нью-Джерси) в десятипроцентном нейтральном забуференном формалине минимум на двенадцать часов. После промакивания досуха аорты перфузировали и погружали в соевое масло (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), среду, дающую сигнал с низкой интенсивностью от рентгеновских лучей для формирования фонового изображения.

Изображения компьютерной микротомографии получали с помощью μCT40 (Sanco Medical, Бассерсдорф, Швейцария) с энергией захвата изображения, составлявшей 45 кВ, током, составлявшим 160 мкА, временем интегрирования, составлявшим 300 миллисекунд, с тремя средними и разрешением изображения, составлявшим двенадцать микрометров. Полученные изображения анализировали с помощью Analyze (AnalyzeDirect Inc., Ленекса, Канзас) путем использования полуавтоматической структурной фильтрации и заданных пользователем участков для определения объема объекта и состава объекта.

Оценка функции сосудов. Функцию сосудов определяли с помощью ультразвукового исследования бедренной артерии в отношении поток-опосредованного расширения и нитроглицерин-опосредованного расширения. Животных умерщвляли при помощи двухпроцентного изофлурана и выдерживали при тридцати семи градусах Цельсия на протяжении тридцати семи минут ультразвукового исследования. Nair использовали для устранения волос с вентральной поверхности задних конечностей и обеспечения возможности получения ультразвукового изображения с помощью Vevo770 с применением пятидесятипятимегагерцового интроскопического зонда (VisualSonics, Торонто, Канада). Для потоко-опосредованного расширения получали исходное изображение бедренной артерии, затем аптечную резинку применяли в качестве временной повязки для перекрытия кровотока в бедренной артерии на четыре минуты. Затем аптечную резинку ослабляли для восстановления кровотока в бедренной артерии и каждую минуту в течение четырех минут получали и анализировали изображение в отношении максимального диаметра бедренной артерии с помощью поставляемых производителем программных средств. Для опосредованного нитроглицерином расширения получали исходное изображение бедренной артерии, затем вводили внутрибрюшинную инъекцию 20 микрограмм нитроглицерина (Baxter, Дирфилд, Иллинойс) и каждую минуту в течение четырех минут получали и анализировали изображение в отношении максимального диаметра бедренной артерии с помощью поставляемых производителем программных средств.

Определение общих холестерина, триглицеридов и липопротеинов. Для определения распределения общих холестерина, триглицеридов и липопротеинов использовали свежие образцы сыворотки крови согласно инструкциям производителя и с применением аналитической системы Cholestech LDX (Inverness Medical, Принстон, Нью-Джерси).

Измерение липополисахаридов в сыворотке крови. Замороженные образцы сыворотки крови оттаивали и разводили в сто раз в воде без эндотоксинов и инкубировали при температуре девяносто градусов Цельсия в течение десяти минут в горячей водяной бане. Образцы затем обрабатывали согласно инструкциям производителя на системе Endosafe-PTS system (Charles River Laboratories, Уилмнгтон, Массачусетс).

GTT: тест на толерантность к глюкозе. Тест на толерантность к глюкозе (GTT) проводили в конце периода приема доз при помощи внутрибрюшинной инъекции 1 г/кг глюкозы после ночного голодания (14 часов). Уровни глюкозы измеряли при помощи глюкометра One Touch Ultra. Потребляемое количество пищи рассчитывали в ходе исследования путем индивидуального размещения мышей на 4 дня, которые представляли собой акклиматизационный период, с последующим измерением в течение однонедельного периода.

Измерение уровней цитокинов в сыворотке крови. Уровни цитокинов в сыворотке крови измеряли с помощью панели Luminex 23 Multiplex (BioRad) автоматизированным способом. Некоторые результаты независимо подтверждали с помощью специальных наборов Individual ELISA (R&D). Общий холестерин и свободные жирные кислоты (FFA) (Roche) определяли с помощью ферментативных реакций.

Результаты:

Ldlr-/-Apobec1-/- мыши точно моделировали атерогенную дислипидемию и были восприимчивы к вызывающим воспаление стимулам. Ldlr-/-Apobec1-/- мышиная модель имела уровни липопротеинов и обширные атеросклеротические повреждения, которые характерны для атеросклеротической болезни у людей (Powell-Braxton et al. (1998). Nat Med 4(8): 934-8). МикроКТ анализ дуги аорты у Ldlr-/-Apobec1-/- мышей выявлял объективные признаки атеросклеротической болезни, которые определяли с помощью методик автоматизированной обработки изображений на подготовленных образцах, которые включали восходящий отдел аорты, дугу аорты, нисходящий отдел аорты и часть брахиоцефальной артерии. С помощью такой методики также наблюдали высокую степень гетерогенности, которая отражала местные отклонения по тяжести и прогрессированию в объеме атеросклеротических бляшек, которые включали липидное ядро, участки разрушенной бляшки и зону кальцификации (фигура 8). Гетерогенность сигнала КТ отражает лежащую в основе

патологию очагов, которая согласуется со сложной патологией бляшек человеческого заболевания. Для характеристики такой модели и демонстрации ее восприимчивости к индуцированному рационом атерогенезу группу мышей обрабатывали при помощи либо рациона с высоким содержанием жиров, либо добавления фруктозы в их питьевую воду (8% масс/объем) на протяжении 2 месяцев. У Ldlr-/-Apobec1-/- мышей наблюдали восприимчивость к изменениям в их рационе по лишь немного повышенному LDL в сыворотке, но по существенному повышению объема атеросклеротических бляшек по сравнению с мышами на стандартном кормовом рационе (фигура 9). Это демонстрировало, что повышение объема атеросклеротических бляшек было вызвано скорее воспалением, чем повышением LDL. Более того, стимуляция острого незначительного воспаления при помощи LPS-стимула (0,025мг/кг) приводила в результате к значительному повышению провоспалительных маркеров у Ldlr-/-Apobec1-/- по сравнению с wt контролями (фигура 10). Ldlr-/-Apobec1-/- мышей также подвергали постоянному введению доз LPS (750 нг, ip) в течение 8 недель и оценивали в отношении липидного профиля сыворотки крови и объема бляшек. Как показано на фигуре 11, постоянное воздействие эндотоксина приводило в результате к развитию дислипидемии и большей нестабильности бляшек.

После обработки посредством IL-22-Fc, у Ldlr-/-Apobec1-/- мышей наблюдали ослабление атерогенной дислипидемии и симптомов метаболического синдрома. У этих мышей на кормовом рационе наблюдали развитие признаков метаболического синдрома, в том числе резистентности к инсулину. При обработке посредством IL-22-Fc, глюкоза в крови натощак уменьшалась по сравнению с контролями, а клиренс глюкозы повышался в группе обработки в сравнении с контрольной группой (фигура 12). Таким образом, гомеостаз глюкозы улучшался с нормализацией толерантности к глюкозе (GTT) и улучшением уровня глюкозы натощак (фигура 12). Как гиперхолестеринемия натощак, так и гиперхолестеринемия после приема пищи уменьшалась (фигура 13A) как и уровни TG после приема пищи (фигура 13B), а липидные профили улучшались (фигура 14). Уровни LPS в плазме крови уменьшались после обработки посредством IL-22-Fc (фигура 15). Помимо уменьшения дислипидемии и чувствительности к инсулину, наблюдали улучшение эндотелиальной функции, измеренной по сосудистой реактивности (фигура 16). Совместно с ослаблением дислипидемии, КТ-анализ объема бляшек показывал уменьшение общего объема атеросклеротических бляшек в аортальной дуге и в брахиоцефальной артерии и клапанах аорты (фигуры 17A-C). Улучшение липидного профиля и резистентности к

инсулину не было связано с уменьшением потребления калорий, поскольку потребление пищи, измеренное на протяжении 7-дневного периода, повышалось несмотря на умеренное, но статистически значимое уменьшение массы тела, которое имело место на протяжении 3 месяцев обработки (фигура 18). Масса тела в контрольной группе не изменялась в ходе осуществления 3-месячного протокола обработки, а у группы обработки IL-22-Fc наблюдали значимое уменьшение массы тела от начала до конца исследования (фигура 18A). Среднее ежедневное потребление пищи, измеренное на протяжении 7-дневного периода в ходе курса исследования обработки, повышался в группе обработки IL-22-Fc по сравнению с контрольной группой (фигура 18B).

Пример 8

Модель заболевания периферических артерий

Стимуляция IL-22-регулируемых путей при помощи IL-22-Fc для уменьшения прогрессирования атеросклероза является потенциально новой формой терапии субъектов с сердечно-сосудистым заболеванием и связанного с ним нарушения, в том числе сахарного диабета и хронического заболевания почек. Поскольку сердечно-сосудистое заболевание, как правило, не ограничено одним участком сосудистой системы субъекта, то субъекта, у которого диагностировано наличие или он подвержен риску наличия болезни коронарных артерий, также считают подверженным риску развития имеющим другие формы CVD, такие как нарушение мозгового кровообращения, заболевание подвздошной артерии и заболевание периферических артерий. Для проверки IL-22 в качестве мишени можно использовать такую же стратегию, как описанная выше, с применением мышиной модели заболевания периферических артерий. Конструкции IL-22-Fc получали и оценивали как описано выше. Также использовали все необходимые контроли. Оценивали агонистов/антигонистов IL-22, и результаты подтверждали пути IL-22 в качестве мишеней для исследования и разработки лекарственного средства.

Применяли модель заболевания периферических артерий (PAD), в основе которой лежит наложение лигатуры на бедренную артерию для создания ишемического повреждения. Эффективность конструкций IL-22-Fc оценивали аналогично ранее описанным процедурам (Couffinhal et al., Am. J. Pathol. 152:1667 (1998); Takeshita et al., Lab. Invst. 75:487 (1996); Isner et al., Human Gene Therapy 7:959(1996)). Для проверки способности IL-22-Fc модулировать такое заболевание периферических артерий

использовали следующие экспериментальные протоколы: a) с применением грызуна (как и в описанном выше способе) на одну сторону бедренной артерии накладывали лигатуру для создания ишемического повреждения мышцы задней конечности (другая, неповрежденная задняя конечность функционировала в качестве контроля); b) полипептид IL-22-Fc (или его фрагмент) вводили животному либо внутривенно, и/либо внутримышечно (в поврежденную конечность) по меньшей мере 3x в неделю в течение 2-3 недель с диапазоном дозировок; и c) ишемизированную мышечную ткань собирали спустя 1, 2 и 3 недели после наложения лигатуры для проведения анализа на биомаркеры и гистологического исследования. В целом, (как и ранее) параметры для оценки включали определение жизнеспособности и васкуляризации ткани, окружавшей ишемизированный участок, в то время как более специфичные параметры оценки могли включать, например, измерения кровотока кожи, температуры кожи и иммуногистохимию с фактором VIII и/или эндотелиальную реакцию на щелочную фосфатазу. Экспрессию полипептида при ишемии исследовали с помощью любой известной из уровня техники методики гибридизации in situ. Также проводили биопсию на другой стороне нормальной мышцы противоположной задней конечности для анализа в качестве контроля.

В альтернативном варианте использовали другие мышиные модели (Pownall et al. US 2011/0118173 A1). Существует несколько мышиных моделей атеросклероза, которые использовали для проверки защиты от атеросклероза. Они включали апо-A-I KO, апо-E KO, цистатионин-бета-синтазу, и аполипопротеин E, и апо-A-I/SR-BI с двойным KO. Эти мышиные модели атеросклероза обрабатывали IL-22-Fc путем введения инъекцией, пероральной дозировки или обработки ex vivo. Измерение уровней холестерина в крови после обработки IL-22-Fc выявляло немедленное понижение общего холестерина в сыворотке крови и повышенное количество нео-HDL последующее появление зрелых форм HDL, которые содержали холестерин, извлеченный из периферической ткани за соответствующий период времени в часах.

Пример 9

Эффект рекомбинантного IL-22 Fc в мышиных моделях сахарного диабета

В наших начальных исследованиях для проверки эффекта IL-22-Fc при метаболических синдромах мы отмечали, что IL-22R KO мыши были более восприимчивы к рациону, вызывавшему ожирение и резистентность к инсулину. В последующих экспериментах мы наблюдали потерю жировой ткани после обработки

рекомбинантным IL-22-Fc. В свете этих данных мы решили проверить роль рекомбинантных IL-22-Fc в мышиных моделях сахарного диабета. В настоящем исследовании оценивали такие конечные точки эффективности, как глюкоза натощак и после приема пищи, масса тела и толерантность к глюкозе и инсулину.

Мышей (10 животных/группа) обрабатывали при помощи либо рекомбинантного IL-22-Fc, либо антитела к антигену амброзии в качестве изотипического IgG-контроля, давая 2 дозы/неделя в течение 3 недель (фигура 19):

Группа 1: *db/db* мыши (BKS.Cg-Dock7(m)+/+ Lepr(db)/J FAT): антитело к антигену амброзии (50 мкг)

Группа 2: *db/db* мыши: рекомбинантный IL-22-Fc (50 мкг)

Группа 3: мыши с индуцированным рационом ожирением (DIO): антитело к антигену амброзии (50 мкг)

Группа 4: мыши с индуцированным рационом ожирением (DIO): рекомбинантный IL-22-Fc (50 мкг)

Самок *db/db* мышей возрастом 12 недель приобретали у Jackson Laboratory и использовали в эксперименте. Перед исследованием мышей акклиматизировали (ежедневный уход) в течение 7-10 дней после прибытия и размещения по-отдельности до начала эксперимента. На протяжении периода от дня -5 до дня -1 забирали кровь (3-5 мкл) через хвостовой надрез для ежедневного измерения исходного уровня глюкозы. В день 0 белки вводили путем i.p. инъекции (150 мкл) в PBS с последующим введение доз два раза в неделю в течение 3 недель. Кровь (3-5 мкл) в этот раз также забирали через хвостовой надрез для измерения глюкозы в день 2, 4, 8, 10, 14, 18 и 21. Для измерения pK 30 мкл крови забирали через орбитальную артерию под анестезией в дни 2, 7, 13 и 20.

Рекомбинантный IL-22-Fc или изотипический IgG-контрольное антитело вводили дозами два раза в неделю внутрибрюшинным путем на протяжении трех недель. Массу тела и глюкозу после приема пищи измеряли каждые 2 дня до окончания исследования на день 23 и замеры глюкозы производили через хвостовой надрез и измеряли с помощью глюкометра (фигуры 20A-B). Для оценки уровня глюкозы натощак и после приема пищи в день 10 утром проводили замеры глюкозы после приема пищи, а затем мышей оставляли без доступа к корму в течение 4 часов (ч) и проводили замеры глюкозы при помощи глюкометра (фигура 20C). Воздействие IL-22-Fc приводило в результате к значимому эффекту снижения уровня глюкозы у *db/db* мышей.

Тест на толерантность к глюкозе (GTT) проводили спустя 2 недели после обработки посредством IL-22-Fc или IgG-контролем в количестве 50 мкг/доза два раза в неделю. Мышам не давали доступ к пище в течение ночи (14 часов). Уровень глюкозы натощак измеряли утром, и он служил в качестве исходного. Измеряли массу тела и забирали кровь (3-5 мкл) через хвостовой надрез для измерения уровня глюкозы. Раствор глюкозы в количестве 1,5 мг/кг массы тела вводили внутрибрюшинно и каждые 30 минут проводили измерение уровня глюкозы. Значения уровня глюкозы представлены на графике для 30, 120, 180 и 220 минут. На день 21 проводили еще один GTT после ночного голодания на день 20. Мышей ежедневно взвешивали. Все группы умерщвляли на день 23 и собирали ткани для гистологического исследования. После обработки посредством IL-22-Fc наблюдали значимое улучшение толерантности к глюкозе и повышение чувствительности к инсулину (фигура 21).

Тест на толерантность к инсулину (ITT) проводили на день 20 на мышах, которых обрабатывали посредством IL-22-Fc или IgG-контроля в количестве 50 мкг/доза два раза в неделю. Мышам не давали доступ к пище в течение 4 часов и производили забор для измерение исходного уровня глюкозы. 1 мЕд/кг массы тела вводили внутрибрюшинно и отслеживали уровни глюкозы в крови путем забора через хвостовые надрезы каждые 30 минут. Для расчета % уменьшения глюкозы исходный уровень глюкозы через 4 часа голодания нормализовали к 100%. Было показано, что обработка IL-22-Fc значимо повышала чувствительность к инсулину, измеренную с помощью теста на толерантность к инсулину (фигуры 22A-B).

IL-22R характеризуется высоким уровнем экспрессии в поджелудочной железе, особенно в ациноцитах, хотя статус его экспрессии в β-островковых клетках все еще не известен. Исследовали инсулиновые сигнал в поджелудочной железе у *db/db* мышей, обработанных IL-22 Fc или контрольным белком. Гистологическую оценку больных сахарным диабетом мышей также проводили для оценки экспрессии инсулина в островковых клетках и уровня перипортального жирового гепатоза у обработанных IL-22-Fc животных. Иммуногистохимическое исследование на инсулин и глюкагон проводили на тканях поджелудочной железы, зафиксированных в формалине и залитых парафином, как было описано ранее (Wu *et al.* 2011, *Science translational medicine* **3**, 113ra126, doi:10.1126/scitranslmed.3002669) с применением антител кролика к глюкагону (Cell Signaling Technologies #2760) с конъюгированным с Alexa Fluor 555 вторичным антителом козы к антителам кролика или с применением антитела морской свинки к инсулину (DAKO A0564) с конъюгированным с Alexa Fluor 647 вторичным

антителом козы к антителам морской свинки. Процент площади инсулина на площадь островка рассчитывали путем деления положительной по инсулину площади на площадь островка минус площадь ядра.

IL-22-Fc, по-видимому, повышала экспрессию инсулина в островках у *db/db* мышей (фигура 23A), а количественный анализ выявлял значимое повышение как интенсивности инсулинового сигнала (фигура 23 B и фигура 24), так и положительной по инсулину площади у обработанных IL-22-Fc животных (фигуры 25), в то время как IL-22 Fc не повышал интенсивность глюкагонового сигнала (фигура 23 C). Для положительной по инсулину площади видно 2,16-кратное увеличение при обработке IL-22-Fc по сравнению с обработкой контролем-герцептином (95% доверительный интервал 1,25-3,72). Количество и площадь островков не подвергалась влиянию обработки IL-22 Fc. Но площадь β-клеток на островок и интенсивность инсулинового окрашивания из обработанной посредством IL-22 Fc поджелудочной железы значимо возрастало (фигуры 23 и 52).

У бета-клеток поджелудочной железы страдавших ожирением мышей наблюдали объективные признаки дегрануляции и дегенерации (данные не приведены). Статистически значимое более сильное окрашивание инсулина наблюдали в бета-клетках страдавшим ожирением мышей, обработанных посредством IL22, по сравнению с необработанными страдавшими ожирением мышами (фигура 23A, B). Повышение, вероятно, было обусловлено повышенным запасанием инсулина в группе обработки IL22. Несмотря на то, что у обработанных посредством IL22 страдавших ожирением мышей наблюдали более высокие уровни инсулина в поджелудочной железе, уровни инсулина в сыворотке крови фактически были уменьшены по сравнению со страдавшими ожирением мышами без обработки IL22, независимо от сытого состояния или натощак (фигура 23D, E). Но обработанные посредством IL22 страдавшие ожирением мыши отвечали на глюкозу путем высвобождения инсулина по такой схеме, которая была более схожа на мышей дикого типа на кормовом рационе, по сравнению с необработанными страдавшими ожирением мышами (фигура 23F). Таким образом, IL22 потенциально улучшал гомеостаз глюкозы у страдавших ожирением мышей путем повышения грануляции и улучшения механизма контроля за высвобождением инсулина у страдавших ожирением мышей.

Затем исследовали эффект IL-22 Fc на гомеостаз инсулина. Мышей, которых кормили HFD, обрабатывали посредством IL-22 Fc два раза в неделю в течение 8 недель. Результаты приведены (фигура 23D и E). Из данных, представленных на фигуре

23F, видны уровни инсулина у мышей через 0 или 30 минут после инъекции глюкозы. Мыши, которых кормили HFD и обрабатывали посредством IL-22 Fc, но не контрольные HFD-мыши, отвечали на инъекцию глюкозы путем повышения уровней инсулина в сыворотке крови аналогично мышам дикого типа на кормовом рационе (нормальном рационе). См. фигуру 23 F. Таким образом, IL-22 улучшал гомеостаз глюкозы у страдавших ожирением мышей и повышал секрецию инсулина в ответ на глюкозу.

Для сравнения мы рассматривали мышей с нокаутом по рецептору IL-22 и их восприимчивость к индуцированному рационом ожирению (DIO) и резистентность к инсулину. IL-22 R KO мышь описана на фигуре 43 и ниже. Мышей с нокаутом по рецептору IL-22 и однопометных контрольных мышей садили на 60% рацион с высоким содержанием жиров с 7-недельного возраста до 10 недель. Для оценки толерантности к глюкозе, индуцированной рационом с высоким содержанием жиров (HFD), мышей лишали доступа к пище на ночь и на следующий день утром проводили тест на толерантность к глюкозе. Для такого эксперимента семинедельных IL-22 R KO мышей и однопометных совпадающих по возрасту контрольных животных (WT: служили в качестве дикого типа) садили на 60% HFD на 10 недель. Мышам внутрибрюшинно вводили инъекцией 1,5 мг/кг массы тела глюкозы и отслеживали уровни глюкозы в крови каждые 30 минут в течение периода, составлявшего 2 часа. Рассчитывали и графически представляли общую площадь под кривой для отдельных мышей. Из данных видно, что уровни глюкозы были значимо выше у IL-22R KO мышей, исходя из общей площади под кривой (фигура 27A-B), что свидетельствовало о том, что рецептор IL-22 играет некоторую роль в HFD-индуцированной толерантности к глюкозе. Мыши с нокаутом по рецептору IL-22 фактически набирали большую массу тела после HFD-кормления по сравнению с однопометными контрольными WT мышами (фигура 28).

Пример 10

Обработка посредством IL-22 склонных к развитию атеросклероза мышей (Ldlr-/-Apobec1-/-), приводившая к уменьшению LPS в сыворотке крови и LDL/HDL в сыворотке крови

Девятимесячным Ldlr -/-, Apobec1 -/- (dko) мышам вводили внутрибрюшинно инъекцией 50 мкг химерного белка IL-22Fc или 50 мкг контрольного антитела к антигену амброзии (n=6 на группу). Спустя сорок восемь часов животных умерщвляли

и собирали сыворотку крови. Анализировали липидные профили с помощью набора для анализа Cholestech LDX и анализировали эндотоксин с помощью набора для анализа с лизатом амебоцитов Limulus. LPS в сыворотке уменьшался на 50% (p=0,0052), а LDL/HDL в сыворотке уменьшался на 30% (p=0,049) с IL-22-Fc по сравнению с контрольным антителом к Fc амброзии (фигура 29).

В заключение, у мышей, обработанных химерным белком IL-22 Fc, были быстрые положительные изменения в липидном профиле и уменьшение эндотоксина в системном кровообращении.

Пример 11

IL-22Fc ускорял закрытие раны в мышиной модели заживления ран у больных диабетом, независимо от того, было ли это системное введение или местное применение

Протокол

Конструкции IL-22-Fc как правило представляли собой химерный белок IL-22-мышиный-IgG2a (SEQ ID NO:72 и 73), который показан на фигурах 32A-B.

Мыши, которые были использованы в исследовании: IL-22R KO мышей и однопометных контрольных мышей дикого типа (WT) разводили в виварии Genentech. IL-22R KO мыши описаны на фигуре 43 и ниже. Использовали 9-недельных самок мышей, больных сахарным диабетом BKS.Cg-Dock7(m)+/+ Lepr(db)/J FAT (*db/db*) и BKS.Cg-Dock7(m)+/- Lepr(db)/J lean (контрольные BKS). Мышей рандомизировали в исследовании по массе тела и уровню глюкозы после приема пищи.

Строго придерживались протокола по исследованию заживления ран в соответствии с Руководством по проведению хирургических операций с сохранением жизни на грызунах IACUC (IACUC Rodent Survival Surgery Guidelines). В течение всей процедуры использовали методику, включающую стерильные условия (в том числе стерильные перчатки, маску, медицинских халат и простыню). После начала стадии анестезии в хирургической операции обривали дорсальную часть спины животных (от области лопатки до области поясницы), щетину удаляли при помощи лосьона для удаления волос (Nair или эквивалент), после этого промывали стерильной водой и предварительно обрабатывали при помощи бетадинового скраба с последующим промыванием спиртом. Животное размещали в положении брюхом книзу, затем использовали 6 мм дерматом для разметки подлежащей удалению области кожи (стерильным маркером на кончике дерматома затем касались кожи). Делали по одной

ране глубиной на всю толщину кожи и с диаметром 6 мм на 1 см левее и правее от срединной линии. Удаляли нижележащий перихондрий при помощи распатора и мелких ножниц.

После этого вокруг круглой раны при помощи суперклея размещали силиконовую рамку толщиной 0,5 мм, внутренним диаметром 10-12 мм. Затем поверх раны и рамки наносили квадрат 2 см клея Tegaderm™ (3M, Сент-Пол, Миннесота) или Opsite® (Smith & Nephew, Inc., Сент-Питерсберг, Флорида) и животному позволяли прийти в себя от амнезии.

Повязки Opsite® удаляли раз в два дня, осматривали раны, местно наносили средства для обработки (20 мкл тестируемого материала или солевого раствора) и наносили свежую повязку. Раневую щель рассчитывали путем измерения диаметра раны от дня 0 до конца исследования.

В некоторых исследованиях уровень глюкозы после приема пищи регистрировали после совершения хвостового надреза и с помощью коммерческого глюкометра Onetouch® (lifeScan, Inc., Милпитас, Калифорния).

Результаты

У IL-22R-/- мышей наблюдали нарушения в реакции заживления кожной раны

Роль передачи сигнала IL-22 в реакция заживления кожной раны исследовали на IL-22R KO (без передачи сигнала IL-22 и членов его семейства IL-20 и IL-24). На фигуре 33 показана кривая размера раневой щели как для IL-22RKO мышей (n=10), так и для контрольных IL-22RWT мышей (n=10) на протяжении 14 дней. Рану диаметром 6 мм создавали на день 0 и измеряли щель каждые 2 дня, начиная с дня 4. У раневой щели IL-22R KO мышей наблюдали значительную задержку в закрытии по сравнению с однопометным контролем WT на период от дня 8 до дня 14. В конце исследования (день 14) 100% ран у WT мышей были закрыты по сравнению лишь с 30% мышей среди IL-22RKO мышей (p=0,005). Различия раневой щели между IL-22RKO и контрольными WT мышами квалифицировали как значимые с $P \leq 0,05$.

Нарушение заживления ран у страдающих ожирением и сахарным диабетом мышей

Реакцию заживления кожной раны в состоянии сахарного диабета моделировали в доклиническом исследовании с помощью страдающих сахарным диабетом мышей с

нокаутом по рецептору лептина (BKS.Cg-Dock7(m)+/+ Lepr(db)/J FAT) (*db/db*) и контрольных худых WT мышей. Создавали круглые раны (6 мм) на спине мыши и регистрировали закрытие раневой щели каждые 2 дня, начиная со дня 4. На фигуре 34 показано закрытие раневой щели (в мм), измеренное со дня 0 по день 27. На протяжении всего периода исследования у ран страдающих сахарным диабетом и ожирением *db/db* мышей наблюдали статистически значимую задержку ($P \leq 0{,}0001$) в закрытии раны по сравнению с худыми мышами. Ко дню 14 100% ран у мышей WT были закрыты, в то время как ни одна из ран у *db/db* мышей не была закрыта даже на день 27 (фигура 35A). Согласно результатам измерения уровней РНК, у мышей дикого типа после совершения раневого надреза индуцировалась экспрессия IL-22, но не у *db/db* мышей. См. фигуру 35B.

IL-22Fc ускорял закрытие раны в модели заживления ран у страдающих сахарным диабетом

Поскольку у IL-22R-/- мышей наблюдали нарушения закрытия раны, то сделали предположение, что IL-22 мог оказывать влияние на закрытие раны. На фигуре 36 показана схематическая диаграмма схемы исследования. 9-недельных самок db/db мышей, страдающих ожирением, использовали для моделирования заживления ран у страдающих сахарным диабетом. Помимо IL-22Fc (мышиного), в качестве положительного контроля использовали антитело к антигену амброзии в качестве контрольного Fc-белка и антитело к FGFR1. Поскольку было показано, что антитело к FGFR1 нормализовало уровень глюкозы в крови в такой доклинической модели, то его применяли в качестве контрольного антитела. На фигуре 36 показана схематическая диаграмма схемы исследования. Группами обработки были:

- антитело к антигену амброзии (внутрибрюшинно (i.p.) 50 мкг/доза, 8 доз);
- IL-22Fc (внутрибрюшинно (i.p.) 50 мкг/доза, 8 доз);
- антитело к FGFR1 (внутрибрюшинно (ip), 0,5 мг/кг на день 0 и день 14).

Как у IL-22Fc, так и у антител к FGFR1 наблюдали статистически значимый ($P \leq 0{,}001$) эффект в снижении уровня глюкозы у страдающих сахарным диабетом мышей по сравнению с обработкой антителом к антигену амброзии (фигура 37). Из данных (фигура 38) видно, что системное введение IL-22 Fc оказывало поразительный эффект на скорость закрытия раны по сравнению с контрольной обработкой антителами к антигену амброзии. Различия раневой щели были значимы, начиная от дня 16 ($P \leq 0{,}05$), и раны у обработанных посредством IL-22Fc мышей полностью закрывались ко

дню 27. У обработанных контрольным Fc антителом, а также антителами к FGFR1 мышей не происходило полное закрытие ран даже на день 27. На фигуре 39 показаны результаты измерения раневой щели у отдельных мышей на день 19, 21 и 27, где различия раневой щели среди обработанных посредством IL-22 Fc групп в сравнении с другими 2 группами имели высокую статистическую значимость ($P \leq 0{,}001$).

Сравнение местной обработки относительно системного лечения посредством IL-22 Fc

На фигуре 40 показана схематическая диаграмма схемы исследования. В этом исследовании сравнивали 2 способа обработки – местную обработку относительно системного лечения. Группы представляли собой:

- антитело к антигену амброзии (местно 50 мкг/доза, 8 доз);
- IL-22Fc (местно, 50 мкг/доза, 8 доз);
- IL-22Fc (внутрибрюшинно (i.p.) 50 мкг/доза, 8 доз).

Из графика на фигуре 41 видно, что как местная обработка посредством IL-22-Fc, так и системное введение IL-22-Fc ускоряли закрытие раны в сравнении с обработкой контрольным антителом. Результаты измерения раневой щели статистически значимо ($P \leq 0{,}001$) отличались в периоде от дня 16 до дня 22. Не наблюдали значимого различия со скоростью закрытия раны между группами местной обработки и системного лечения посредством IL-22 Fc. См также фигуру 42.

Пример 12

У страдающих ожирением мышей наблюдали сниженную индукцию IL-22

В приведенных далее экспериментах исследовали регуляцию IL-22 в ходе иммунных реакций у страдающих ожирением мышей. Основными источниками IL-22 среди лейкоцитов являются лимфоциты врожденного иммунитета (ILC) и подклассы Т-хелперов, особенно Th17 и Th22 клетки. Исследовали выработку IL-22 у CD4+ Т-клеток при стимуляции антигеном у дефицитных по рецептору лептина *db/db* мышей.

Протокол

***In vivo* обработка посредством OVA и флагеллина.** Для активации CD4 Т-клеток *in vivo* 100 мкг OVA, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда (CFA) вводили подкожной инъекцией в нижнюю часть спины животных и на день 7 собирали

паховые лимфатические узлы. Для активации TLR5 вводили внутривенной инъекцией 3 мкг ультра-чистого флагеллина (InvivoGen) и через 2 часа собирали образцы сыворотки крови.

Мыши. Дефицитных по рецептору лептина мышей (*db/db*; BKS.Cg-*Dock7*^{m}+/+ *Lepr*^{db}/J или B6.BKS(D)-*Lepr*^{db}/J), дефицитных по лептину мышей (*ob/ob*; B6.Cg-*Lep*^{ob}/J) и соответствующих ним худых контрольных мышей, а также мышей на рационе с высоким содержанием жиров (C57BL/6J 60%DIO) и контрольных мышей на стандартном кормовом рационе приобретали у Jackson Laboratory. Дефицитные по IL-22 мыши (Zheng et al, 2007, *Nature* **445**, 648-651) и дефицитные по IL-22Rα1 мыши (описаны на фигуре 43 и ниже) были созданы компанией Lexicon Pharmaceuticals и подвергнуты возвратному скрещиванию с линией C57BL/6 более 10 раз. Если было указано, мышей кормили рационом с скорректированным содержанием калорий (HFD, содержавший 60% жира, Harlan), начиная с возраста 4–6 недель. Для исследования метаболизма использовали мышей возрастом 12–18 недель, в то время как для исследования инфекций *C. rodentium* использовали мышей возрастом 5–6 недель. Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных компании Genentech.

Очистка и дифференцировка наивных CD4 Т-клеток. Наивные CD4 Т-клетки сортировали и стимулировали как описано ранее (Rutz, *et al.* 2011, Nature Immunol. 12:1238-45) и культивировали в специальных условиях для каждого подкласса аналогично ранее описанному способу. *Id.* Для индукции IL-22, если было указано, применяли антитела к IL-4 (10 мкг/мл), антитело к IFN-γ (10 мкг/мл), и рекомбинантный IL-6 (20 нг/мл); добавляли рекомбинантный мышиный лептин (1 мкг/мл, R&D systems).

Внутриклеточное окрашивание и ELISA на IL-22. Очищенные из дренирующих лимфатических узлов лимфоциты красили на IL-22 и IL-17A как описано ранее (Zheng *et al., ранее*) с помощью сшитого с фикоэритрином (PE) антитела к IL-22 (1H8PWSR, eBioscience) и сшитого с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антитела к IL-17A (17B7, eBiosceince). ELISA на IL-22 проводили как описано ранее (Zheng *et al., ранее*) с применением моноклональных антител к IL-22 (20E5 и 14B7, Genentech).

Выделение РНК и ПЦР в режиме реального времени. Собирали и обрабатывали толстую кишку и выделяли иРНК с помощью набора RNeasy mini plus kit (Qiagen). Уровни иРНК *Il22, Il22ra1* и *Reg3b* оценивали с помощью анализа ПЦР в режиме реального времени как сообщалось ранее (Ota *et al.* 2011, *Nature immunol.* **12**,

941-948). Результаты нормализовали к результатам контрольного гена "домашнего хозяйства" *Rpl19* (кодирующего рибосомальный белок L19) и регистрировали как $2^{\square CT}$. Последовательности праймеров и зондов для *Il22* и *Reg3b* были приведены ранее. *Id.* Для *Il22ra1* применяли 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) и 5'–FAM–CCA CCC CAC ACT CAC ACC GG–TAMRA–3' (SEQ ID NO:76).

Статистический анализ Весь статистический анализ проводили с помощью двухвыборочного t-критерия для независимых выборок. *P*-значение менее 0,05 считали статистически значимым.

Результаты

После иммунизации мышей овальбумином (OVA) в полном адъюванте Фрейнда (CFA) ex vivo детектировали экспрессировавшие IL-22 CD4 Т-клетки с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов. Количество IL-22$^+$ Т-клеток значимо уменьшалось у *db/db* мышей (фигуры 44 A-B). В соответствии с предыдущими результатами, количество IL-17$^+$ CD4 Т-клеток также значимо уменьшалось у *db/db* мышей (фигура 45A). Аналогичные результаты наблюдали также у дефицитных по лептину *ob/ob* мышей (фигура 45B). Лептин может регулировать Th-клетки, такие как тоящем документе в наиболее широком смысле. али непосредственного влияния лептина на выработку IL-22 у in vitro дифференцированных Th22-клеток (фигура 45C). Более того, аналогичное уменьшение количества вырабатывавших IL-22 Т-клеток также наблюдали у иммунизированных DIO (с индуцированным рационом ожирением или которых кормили HFD) C57BL/6 (фигуры 44C и D), что свидетельствовало о том, что ожирение, но не отсутствие передачи сигнала с участием лептина, могло быть ответственным за уменьшенную выработку IL-22 у CD4$^+$ Т-клеток. Активация TLR5-пути при помощи флагеллина могла бы стимулировать выработку IL-22 у ILC.

У *db/db* мышей (фигура 44E), *ob/ob* мышей (фигура 45E) и DIO мышей (фигура 44F) уровень IL-22 в сыворотке крови был значимо ниже, чем у WT мышей при in vivo стимуляции флагеллином. В соответствии с результатами, полученными от Т-клеток, сам по себе лептин не повышал выработку IL-22 у ILC in vitro (фигура 45D). В своей совокупности эти данные свидетельствовали о том, что имело место общее нарушение в индукции IL-22 как у ILC, так и у Т клеток страдающих ожирением мышей.

<u>Пример 13</u>

Защита на уровне слизистых оболочек была нарушена у дефицитных по лептину мышей и восстанавливалась при помощи химерного белка IL-22 Fc

IL-22, вырабатываемый ILC и Т-клетками, необходим для иммунной защиты от инфицирования *Citrobecter rodentium* в толстой кишке. Анализировали индукцию IL-22 в толстой кишке от *db/db* и *ob/ob* мышей, инфицированных *C. rodentium*. *C. rodentium* культивировали в течение ночи и мышей перорально заражали $2x10^9$ CFU бактерий, как было описано ранее (Zheng *et al.* 2008, *Nature medicine* **14**, 282-289, doi:10.1038/nm1720). Бактериальную нагрузку анализировали следующим образом: селезенку и печень инфицированных мышей собирали, взвешивали и гомогенизировали в 0,1% NP40/PBS в С-пробирке при помощи gentleMACS (Miltenyi Biotec). Серийно разведенные гомогенаты высевали на агар MacConkey (Remel) и выявляли колонии *C. rodentium* как розовые колонии, развившиеся после инкубирования на протяжении ночи при 37°C. Если было указано, мышам вводили внутримышечной инъекцией IL-22–Fc (150 мкг/доза) или эквивалентное количество мышиного изотипического контроля 3 раза в неделю. Гистологический анализ толстой кишки от мышей, инфицированных *C. rodentium*, проводили как описано ранее (Ota *et al.* 2011, *Nature immunology* **12**, 941-948, doi:10.1038/ni.2089) и оценивали изменения эпителия (пролиферацию, пузырение, шелушение энтероцитов), воспаление и толщину слизистой оболочки. Клинические оценки проводили для четырех анатомических областей – проксимального, срединного и дистального отдела толстой кишки и прямой кишки – по шкале от 0 до 5, при этом 0 = нормальная толстая кишка, а 5 = тяжелое заболевание. Оценки по областям суммировали с получением конечной оценки тяжести заболевания толстой кишки для каждого животного.

В дополнение приведенным выше результатам, пиковая индукция IL-22 на день 4 в толстой кишке у *db/db* и *ob/ob* мышей также значимо уменьшалась, но полностью не прекращалась (фигура 46A). У *db/db* мышей после перорального заражения *C. rodentium* отсутствовала значимая потеря массы (фигура 46B). К удивлению, инфицированные *db/db* мыши начинали умирать спустя 10 дней после заражения бактериями и приблизительно 60% - 100% *db/db* мышей погибали в течение второй недели инфекции при повторных экспериментах (фигура 46C). Гистологический анализ срезов толстой кишки от *db/db* мышей выявлял повышенную инфильтрацию воспалительных клеток и серьезные повреждения эпителия, в том числе шелушение эпителия на поверхности слизистых оболочек (фигуры 46 D-F). Кроме того, у этих мышей наблюдали очаговые отеки подслизистой оболочки и многоочаговые

бактериальные колонии, которые зачастую были ассоциированы с локальным некрозом. Значимо повышенные бактериальные нагрузки также детектировали как в печени, так и в селезенке *db/db* мышей (фигуры 46 G-H). Схожие нарушения защиты на уровне слизистых оболочек наблюдали также у *ob/ob* мышей (фигура 54). Неожиданностью было то, что у *db/db* мышей имело место значимое нарушение в борьбе с инфекцией *C. rodentium*; особенно с учетом того, что индукция IL-22 инфекцией C. rodentium у этих мышей была лишь частично нарушена (см. фигуру 46A).

Имели место сообщения, что у дефицитных по лептину мышей также были нарушения B-клеточных функций и на поздней фазе инфекции для окончательного устранения бактерий у хозяина необходимо было антитело против *C. rodentium*. Поэтому у таких мышей исследовали выработку антитела к *C. rodentium*. Образцы сыворотки крови собирали путем кровопускания из подчелюстной вены на 10 день после инфицирования. На планшет для ELISA наносили покрытие из инактивированных теплом *C. rodentium* или козиного антитела захвата к Ig мыши. Планшет с нанесенным покрытием промывали промывочным буфером (0,05% твин 20 в PBS), блокировали в течение 2 часов блокирующим буфером (0,5% BSA, 15 ppm проклина в PBS) и промывали перед добавлением серийно разведенного стандартного моноклонального IgG мыши (SouthernBiotech) или образцов сыворотки крови. Через 2 часа инкубации при комнатной температуре планшет промывали и детектировали Ig при помощи антитела козы к IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (SouthernBiotech), разведенного 1/4000 в растворе для разведения (0,5% BSA, 0,05% твин 20, 15 ppm проклина в PBS), и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. После промывания в каждую лунку добавляли пероксидазный субстрат TMB (Sigma-Aldrich). Считывали поглощение на 650 нм в считывающем устройстве для планшетов (Molecular Devices).

Титр антитела IgG к *C. rodentium* был значимо уменьшен у выживших *db/db* мышей на 14 день после инфицирования (фигура 46I). Тем не менее, уменьшенная выработка IgG к *C. rodentium* сама по себе также не должна была приводить к наблюдаемой ранней смертности, поскольку дефицитные по Rag2 мыши, у которых полностью отсутствовали B-клетки и выработка антител, могли выживать намного дольше после инфицирования (Zheng *et al.* 2008, *Nature medicine* **14**, 282-289). Таким образом, неудовлетворительная иммунная защита от *C. rodentium* у *db/db* мышей, по всей видимости, была вызвана нарушениями как в адаптивном ответе с выработкой антител, так и в индукции IL-22 у ILC. Затем проводили эксперимент по исследованию

того, мог ли IL-22, в результате введения экзогенного IL-22–Fc, восстанавливать защитные свойства слизистых оболочек у *db/db* мышей при инфицировании *C. rodentium*. Как показано на фигуре 46 J, несмотря на то, что основная часть контрольных IgG-обработанных *db/db* мышей погибала, почти все обработанные посредством IL-22 Fc *db/db* мыши переживали инфекцию (фигура 46J), что подтверждало, что IL-22 Fc мог терапевтически восстанавливать нарушения иммунных реакций на уровне слизистых оболочек у *db/db* мышей.

Пример 14

IL-22 Fc уменьшал уровни глюкозы у страдающих ожирением мышей и нормальных мышей, которых кормили рационом с высоким содержанием жиров

Как ранее описано в Примере 9, IL-22 Fc уменьшал уровни глюкозы у *db/db* мышей, у которых уже развилась гипергликемия (фигура 20A). Терапевтический эффект был стойким в течение курса введения IL-22–Fc. Спустя 3 недели обработки уровень глюкозы у таких мышей падал ниже 200 мг/дл, близкому к нормальному уровню глюкозы у WT мышей, в то время как у обрабатываемых контрольным белком *db/db* мышей сохранялся их высоких уровень глюкозы. Снижение глюкозы в обработанных посредством IL-22 Fc мышей было более очевидным, если мыши были в состоянии натощак (фигура 20C). Обработка посредством IL-22 Fc также приводила в результате к тенденции потери массы или задерживающегося увеличения массы по сравнению с контрольной обработкой. Тем не менее, в конце такого исследования разница масс у двух групп таких мышей не достигала статистически значимости (фигура 20B). В подтверждении этих данных, обработка IL-22 Fc приводила к развитию значимо уменьшенной толерантности к глюкозе и повышенной чувствительности к инсулину в тесте на толерантность к глюкозе и тесте на толерантность к инсулину (фигуры 21 и фигура 22, соответственно).

Для подтверждения общих благоприятных действий экзогенного IL-22 в модулировании метаболических нарушений IL-22 Fc вводили в течение 4 недель C57BL/6 мышам, которых предварительно кормили HFD в течение по меньшей мере 8 недель для индукции толерантности к глюкозе. Для проведения теста на толерантность к глюкозе (GTT) мышей лишали доступа к пище на ночь и вводили i.p. инъекцией раствор глюкозы в количестве 1,5 мг/кг. Для проведения теста на толерантность к инсулину (ITT) мышам вводили i.p. инъекцией раствор инсулина в количестве 1,0

единицы/кг. Уровень глюкозы в крови измеряли до и после инъекции. Глюкозу в крови измеряли при помощи системы Contour (Bayer).

В соответствии с результатами, полученными от *db/db* мышей, обработка посредством IL-22 Fc значимо уменьшала уровень глюкозы в сыворотке крови, особенно после голодания (фигура 47A). Также имела место уменьшенная масса тела (или задерживающееся увеличение массы) у обрабатываемой посредством IL-22 Fc группы в конце исследования (фигура 47B). Кроме того, IL-22 Fc снижал нарушение толерантности к глюкозе и резистентность к инсулину у C57BL/6 мышей, которых кормили HFD (фигуры 47C и D). Аналогичные результаты получали при параллельном введении мышам IL-22 Fc в начале кормления HFD (фигура 48). В своей совокупности эти данные демонстрировали, что IL-22 Fc представлял собой потенциальное терапевтическое средство для нормализации концентрации глюкозы в сыворотке крови и уменьшения нарушения толерантности к глюкозе и резистентности к инсулину у страдающих ожирением мышей.

Пример 15

IL-22 Fc уменьшал потребляемое количество пищи и повышал экспрессию PYY у мышей, которые страдали ожирением и которых кормили HFD

Уменьшение потребляемого количества пищи могло обращать гипергликемию и резистентность к инсулину у страдающих сахарным диабетом мышей. Действительно, у *db/db* мышей, обработанных посредством IL-22 Fc, наблюдали значимое уменьшение потребления пищи по сравнению с контрольной группой (фигура 49A). Проводили эксперименты с одинаковым питанием для того, чтобы удостовериться в одинаковых показателях потребления пищи у обрабатываемых IL-22 Fc и контролем мышей (фигура 50). Потребление пиши измеряли для группы, которую кормили без ограничений, ежедневно на протяжении исследования. Подаваемую пищу для группы с таким же питанием ограничивали для приведения в соответствие с потребляемым количеством пищи на предыдущий день у группы, которую кормили без ограничений. Соответственно, обработка и измерение у группы с таким же питанием были на следующий день после группы, которую кормили без ограничений.

Даже в таких условиях IL-22 Fc значимо уменьшал уровень глюкозы в сыворотке крови, хотя и в более поздний момент времени (фигура 49B), и обращал толерантность к глюкозе у *db/db* мышей (фигура 49C), что свидетельствовало о том, что модуляция потребляемого количества пищи при помощи IL-22 была не единственным механизмом

для достижения терапевтического эффекта при метаболическом заболевании. Аналогичные результаты наблюдали у мышей, которых кормили HFD (данные не приведены). Для дополнительного понимания того, как IL-22 регулировал потребляемое количество пищи и метаболизм, исследовали экспрессию гормонов кишечника, PYY, который известен как подавляющий потребление пищи.

Мышам вводили i.p. инъекцией 50 мкг IL-22–Fc на день 0 и 2. На день 4 мышей лишали доступа к пище на ночь и возобновляли кормление на 1 час на день 5. Образцы крови забирали на день 2 до обработки и на день 5 после кормления. Все образцы сыворотки крови сразу после забора смешивали с ингибитором протеаз (Sigma), ингибитором DPPIV (Millipore) и Pefabloc (Roche). PYY измеряли при помощи набора PYY ELISA kit (Abnova) согласно инструкциям производителя. Из результатов видно, что обработка посредством IL-22 Fc значимо повышала концентрацию PYY в сыворотке крови *db/db* мышей и мышей, которых кормили HFD (фигуры 49 D и E). Для демонстрации того, что эффект IL22 на потребление пищи был опосредован стимуляцией выработки PYY, исследовали потребление пищи у мышей, обработанных посредством ингибитора PYY, BIIE0246. C57BL/6 мышей на нормальном рационе либо оставляли без обработки, либо обрабатывали посредством IL-22 Fc на день 2 и день 4. После голодания в течение ночи измеряли потребление пищи на протяжении 4-часового периода кормления. Из результатов видно, что уменьшение потребления пищи у обработанных посредством IL-22 Fc мышей обращалось под действием BIIE0246 (данные не приведены), что указывало на то, что эффект IL-22 Fc на уменьшенное потребление пищи был опосредован индукцией PYY.

Пример 16

IL-22 Fc уменьшал LPS в сыворотке крови и ALT и AST печени и повышал метаболизм липидов у страдающих ожирением мышей

Поскольку рецептор IL-22 экспрессируется во многих органах, в том числе печени и поджелудочной железе, которые регулируют метаболизм, то вероятно, что терапевтические эффекты IL-22 при метаболических заболеваниях опосредуется различными механизмами. Метаболический эндотоксикоз вносит вклад в воспалительный статус, а резистентность к инсулину и модуляция кишечной микробиоты повышают толерантность к глюкозе. Эндотоксин в сыворотке крови измеряли при помощи набора для анализа с лизатом амебоцитов Limulus, QCL-1000 (Lonza), согласно инструкциям производителя. ALT и AST измеряли при помощи

анализатора Cholestech LDX (Alere). Из результатов, показанных на фигуре 49F, видно, что обработка посредством IL-22 Fc приводила в результате к значимому уменьшению количества LPS в сыворотке крови от *db/db* мышей.

IL-22 мог репрессировать вовлеченные в липогенез гены и облегчать жировой гепатоз печени. Затем исследовали уровни ALT и AST в сыворотке крови. Глюкозу в крови измеряли при помощи системы Contour (Bayer). ALT и AST измеряли при помощи анализатора Cholestech LDX (Alere). Как показано на фигурах 51A и B, обработка посредством IL-22 Fc снижала уровни ALT и AST в сыворотке крови у *db/db* (фигура 51A) мышей и мышей, которых кормили HFD (фигура 51B). Абдоминальный жир также значимо уменьшался при обработке посредством IL-22 Fc у мышей, которых кормили HFD (фигура 51C). Кроме того, у первичных адипоцитов под действием IL-22 индуцировались гены, ответственные за метаболизм липидов (фигура 51D). Затем исследовали эффект IL-22 на содержание триглицерида и холестерина в печени и жировой ткани. Из результатов видно, что IL-22 Fc уменьшал содержание триглицерида, холестерина и свободных жирных кислот (FFA) (фигура 51E), а также печеночного триглицерида (фигура 51F), печеночного холестерина (фигура 51G) и триглицерида в белой жировой ткани (фигура 51H) у мышей, которых кормили HFD. Аналогичным образом, IL-22 уменьшал содержание триглицерида в печени и белой жировой ткани у *db/db* мышей (фигура 51I и фигура 51J). Дополнительные эксперименты показывали, что обработка посредством IL-22 Fc уменьшала воспалительные цитокины, такие как TNFα и IL-1β, по сравнению с отсутствием обработки у страдающих ожирением мышей (данные не приведены). Г/Э окрашивание срезов печени выявляло снижение перипортального жирового гепатоза при обработке посредством химерного белка IL-22 Fc (фигура 26).

IL-22 передает сигналы через IL-22R1 и IL-10R2 цепи. IL-22R1 также может сочетаться с IL-20R2 цепью и использоваться IL-20 и IL-24. Было показано, что все эти лиганды индуцировали очень сходные последующие биологические эффекты, начиная от эпидермиса кожи (Sa *et al.*, 2007, *J Immunol* **178**, 2229-2240). Таким образом, дефицитных как по IL-22, так и по IL-22R1 мышей исследовали для того, чтобы избежать потенциального дублирования других цитокинов при индуцированном при помощи HFD сахарном диабете. Создание нокаутных по IL-22R мышей проиллюстрировано на фигуре 43 A. Делецию IL-22R1 у KO мышей подтверждали по отсутствию иРНК IL-22R1 у IL-22R KO мышей и отсутствию экспрессии иРНК RegIIIb

в ответ на IL-22 Fc у IL-22R KO мышей. См. фигуры 43 B и C. Кроме того, введение IL-22-Fc IL-22R KO мышам не индуцировало pStat3 (данные не приведены).

Не наблюдали различия по толерантности к глюкозе и массе тела у дефицитных по IL-22 мышей от мышей однопометных контролей WT (фигура 53). При обработке дефицитных по IL-22R1 мышей согласно рационам с высоким содержанием жиров в течение трех месяцев, тем не менее, у этих мышей развивалась значимо более тяжелая толерантность к глюкозе и сильнее увеличивалась масса (фигуры 49G, H и I), что подтверждало важную роль пути IL-22R в управлении метаболизмом. Исследовали возможность дублирования IL-20 и IL-24 при уменьшении метаболического синдрома. В этом эксперименте *db/db* мышей обрабатывали посредством IL-20 Fc, IL-22 Fc или IL-24 Fc. Из результатов видно, что только IL-22 Fc уменьшал уровень глюкозы в сыворотке крови (фигура 55B) и уменьшал толерантность к глюкозе в анализе GTT на день 20 (фигура 55C) у db/db мышей, в то время как обработка *db/db* мышей посредством IL-20 Fc или IL-24 Fc не уменьшала. Уменьшение массы тела не было статистически значимым. В дополнительных экспериментах наблюдали, что, хотя IL-20 Fc и IL-24 индуцировали pStat3 у первичных адипоцитов, эти цитокины не индуцировали pStat3 в ткани печени от *db/db* мышей, которые становились невосприимчивыми к инсулину (данные не приведены). Обработка IL-22 Fc у IL-22R KO мышей не оказывала эффекта в тесте на толерантность к глюкозе, что подтверждало, что эффект IL-22 Fc проявлялся благодаря проведению сигнала от IL-22 R (данные не приведены).

Представленные в настоящем документе результаты исследований указывают на важные функции IL-22 в регулировке метаболических процессов. Дефицитные по IL-22R1 мыши были предрасположены к развитию метаболических синдромов. Экзогенный IL-22 не только мог восстанавливать нарушения иммунных реакций на уровне слизистых оболочек в доклинических моделях сахарного диабета, но также способствовал нормализации глюкозного и липидного метаболизма. Таким образом, IL-22 может обеспечить новый терапевтический подход для лечения метаболических нарушений у человека.

Пример 17

Сравнение VGEF и IL-22 в стимуляции заживления ран у *db/db* мышей

В этом эксперименте анализировали эффект IL-22 на стимуляцию или улучшение заживления ран и сравнивали его с VEGF. Самок BKS.Cg-*Dock7*^{m} +/+ *Lepr*^{db}/J *db/db* мышей возрастом 11 недель приобретали у Jackson Laboratory, Бар Харбор, Мэн. Все исследования на экспериментальных животных проводили с одобрения Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных компании Genentech Lab Animal Research. Под анастезией изофлураном обривали дорсальную кожу, затем наносили крем-депиляторий для удаления оставшейся щетины. После этого кожу очищали и предварительно обрабатывали при помощи повидон-йода с последующим промакиванием спиртом при помощи тампона, производили круглую рану на всю толщину кожи на дорсальной коже каждой мыши при помощи одноразового 6 мм дерматома (Miltex, Inc.). Рану закрывали при помощи пленки Tegaderm до и после обработки.

Из результатов на фигуре 56 видно, что VEGF, по-видимому, осуществлял более быстрое закрытие поверхности по сравнению с IL-22; тем не менее, при изучении кожи со стороны дермы выявляли, что раны, обработанные VEGF, оставались открытыми даже на день 21 (фигура 56B). Также анализировали способность VEGF и IL-22 Fc стимулировать ангиогенез на месте раны. В этом эксперименте рассекали две 6 мм раны у *db/db* мышей на день 0. На день 2, 4, 6, 8, 10 и 12 на ранах местно применяли либо контрольное антитело к антигену амброзии, либо IL-22 Fc (50 мкг), либо VEGF (20 мкг) в солевом растворе. На день 6 и 12 трех мышей из каждой группы забирали для гистологического и иммуногистохимического анализа и окрашивания при помощи BrdU. На день 16 одну мышь забирали для окрашивания при помощи BrdU. На день 18, 20 и 22 одну мышь из каждой группы забирали для каждого момента времени для иммуногистохимического анализа и окрашивания по CD31 всей ткани. Из результатов видно, что как VEGF, так и IL22-Fc, но не контрольное антитело к антигену амброзии, стимулировали образование кровеносных сосудов на месте раны, что выявляли при помощи анализа путем иммуноокрашивания ткани по CD31 (данные не приведены).

Затем, мы анализировали индуцированную посредством IL-22 и индуцированную другими членами семейства IL-10 экспрессию цитокинов и хемокинов в реконструированном эпидермисе. Реконструированный эпидермис представлял собой модели тканей RHE EpiDerm, которые хранили в среде EPI-100-NMM, приобретенной у MatTek. См. Sa *et al*. 2007, *J. Immunol*. 178:2229-2240. Из результатов видно, что IL-22 заметно индуцировал экспрессию IL-8, CXCL-1, MIP 3a, DMC и MCP-1 в реконструированном эпидермисе человека, хотя также наблюдали индукцию при

помощи IL-19, IL-20 или IL-24 (фигура 57). С учетом эффекта IL-22 на заживление ран, которое описано в настоящем документе, IL-19, IL-20 и IL-24 также могут играть роль в ускорении заживления ран.

Пример 18

IL-22 обеспечивал превосходящую эффективность при обработке инфицированной раны, чем VEGF и PDGF в модели раны с наложенной шиной у db/db мышей

В мышиной модели заживления ран для большой части закрытия раны предусмотрено стягивание, поскольку мышиная кожа очень подвижна. Для более точного сходства с процессом заживления раны у людей создавали модель раны с наложенной шиной, в которой силиконовое кольцо приклеивали к коже и закрепляли при помощи хирургической нити вокруг раны для предупреждения локального стягивания кожи (см. иллюстративные изображения на фигуре 59B). См., например, Zhao et al., 2012, Wound Rep. Reg. 20:342-352, и Brubaker et al., 2013, J. Immunol., 190:1746-57. В этой модели раны заживали благодаря процессам грануляции и реэпителиализации, которые сходны с процессами заживления ран у людей. Для наложения шины на рану на одну сторону стерильной силиконовой шины (Grace Bio-Labs, Inc.) наносили клей Krazy glue (Elmer's Products, Inc.) и аккуратно размещали шину вокруг раны при помощи клея на ее нижней стороне так, чтобы рана находилась в центре шины. Клей связывался с кожей при соприкосновении и служил в качестве шины в течение всего хода исследования. Шину дополнительно фиксировали на коже при помощи четырех прерывистых хирургических швов из мононити из нейлона 6.0 (Ethicon, Inc.). Получали цифровое изображение раны до покрытия раны прозрачной пленкой Tegaderm. Кроме того, микробная инфекция на открытой ране может задерживать заживление ран, а хронические раны, такие как хронические раны, наблюдаемые у больных сахарным диабетом, зачастую являются инфицированными ранами.

С помощью модели раны с наложением шины исследовали эффект IL-22 Fc на инфицированную рану у *db/db* мышей. Раны, рассеченные как описано выше, у мышей дикого типа или *db/db* мышей заражали местно при помощи 0,5 x 10^6 CFU, 1 x 10^6 CFU (бляшкообразующих единиц) или 2 x 10^6 CFU *Staphylococcus aureus* спустя два дня после рассечения раны. Как показано на фигуре 58, у *db/db* мышей наблюдали задержанное заживление ран по сравнению с мышами дикого типа, и заживление ран у

таких мышей по сравнению с контрольными дополнительно задерживалось при инфицировании раны бактериями.

В отдельных экспериментах заживляющий рану эффект IL-22 сравнивали с другими средствами в модели инфицированной раны с наложением шины. Спустя два дня после рассечения раны поверхность раны заражали устойчивым к метициллину штаммом *S. aureus* USA300 NRS 384 (NARSA) в количестве 1 x 10^6 CFU в 30 мкл солевого раствора и снова закрывали ее пленкой Tegaderm. Местную обработку начинали спустя 48 часов после инфицирования *S. aureus* посредством 30 мкг либо IL22-Fc, либо VEGF (№ партии 110308, Genentech), либо PDGF (№ партии 0507CY420, PeproTech, Inc.) в 30 мкл солевого раствора, в дальнейшем 3 раза в неделю. Цифровые изображения раны записывали до обработки и два раза в неделю после обработки до закрытия ран. Процент закрытия раны рассчитывали, исходя из изображений раны, с помощью ImageJ, базирующейся на технологии java программы обработки изображений, разработанной в NIH.

Как показано на фигуре 59, IL-22 Fc стимулировал более быстрое заживление ран, чем VEGF, при нанесении одинакового количества соединений на инфицированные раны в модели раны с наложением шины, которая имела более точное сходство с заживлением ран у человека. Затем тестировали различные дозы VEGF и IL-22 Fc на инфицированных ранах. В этом эксперименте производили одну рассеченную рану диаметром 6 мм с наложенной шиной у *db/db* мышей с уровнем глюкозы в крови > 300 мг/дл. Каждую рану заражали посредством 1 x 10^6 CFU *S. aureus* USA 300. Различные дозы VEGF или IL-22 Fc в солевом растворе применяли местно три раза в неделю до закрытия раны. В качестве контроля применяли солевой раствор. После закрытия ран мышей умерщвляли, а образцы подвергали гистологическому, иммуногистохимическому и ПЦР анализу и подсчитывали CFU. Из результатов на фигуре 60 видно, что для IL-22 Fc в количестве 30 мкг наблюдали более хорошую эффективность заживления инфицированных ран, чем для 60 мкг VEGF. Таким образом, более быстрое закрытие поверхности под действием VEGF, которое наблюдали в модели раны без наложения шины, вероятно было обусловлено стягиванием кожи мыши, а эффекты IL-22 Fc на стимуляцию пролиферации кератиноцитов и реэпителизации, по-видимому, перекрывались стягиванием кожи мыши.

Аналогичные результаты показаны на фигуре 61, на которой продемонстрировано, что IL-22 Fc обладал превосходящей эффективностью, по

сравнению с VEGF и PDGF, при нанесении на рану одинакового количества (30 мкг) каждого соединения. Полное закрытие у обработанной посредством IL-22 Fc инфицированной раны с наложением шины наблюдали на день 15. У обработанных посредством VEGF или PDGF мышей, тем не менее, полное закрытие инфицированной раны с наложением шины не наблюдали до дня 25, равно так же, как и у необработанной неинфицированной раны. Закрытие раны в контрольной группе, т. е. необработанной инфицированной раны, не наблюдали до дня 29. Без ограничения до конкретного механизма(механизмов), преимущество IL-22 Fc в стимуляции заживления ран, по сравнению с VEGF или PDGF, могло быть обусловлено его эффектами на реэпителизацию, стимуляцию пролиферации кератиноцитов, индукцию реваскуляризации, индукцию протеаз для облегчения ремоделирования и репарации тканей и противомикробные активности.

Затем мы тестировали, можно ли IL-22 Fc применять в гелеобразном составе для заживления ран. Иллюстративный гелеобразный состав, который применяли в таком эксперименте, содержал 10 мМ фосфат натрия с pH 7,1 с 0,5 мг/г метионина и 3% гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC E4M premium от Dow Chemicals), с или без 1 мг/г IL-22 Fc. Гель-раствор и раствор IL-22 Fc смешивали перед местным нанесением на рану с наложением шины. Состав, содержавший IL-22 Fc, также содержал небольшое количество сахарозы (< 20 мМ) и P20 (< 0.002%), которые переносили из исходного состава для белков. Из результатов, показанных на фигуре 62, видно, что IL-22 Fc как в растворе, так и в гелеобразном составе стимулировал заживление у неинфицированной раны с наложением шины.

Полагают, что описание является достаточным для того, чтобы специалист в настоящей области техники смог осуществить на практике настоящее изобретение. Хотя приведенное выше настоящее изобретение для полной ясности понимания было описано довольно подробно при помощи иллюстрации и примера, описания и примеры не следует истолковывать в качестве ограничения объема настоящего изобретения. Фактически, из приведенного выше описания специалистам в настоящей области техники будут очевидны различные модификации настоящего изобретения, помимо показанных и описанных в настоящем документе, и все они подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный белок интерлейкин (IL)-22 Fc, содержащий полипептид IL-22, соединенный с Fc участком IgG посредством линкера, причем Fc участок не является гликозилированным.

2. Химерный белок IL-22 Fc по п.1, причем Fc участок содержит измененный консенсусный сайт гликозилирования.

3. Химерный белок IL-22 Fc по пп.1 или 2, причем Fc участок содержит вставку, делецию или заместительную мутацию, которые приводят к агликозилированному Fc участку.

4. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп.1-3, причем аминокислотный остаток в позиции 297 нумерация по EU Fc участка заменен и/или аминокислотный остаток в позиции 299 нумерация по EU Fc участка заменен.

5. Химерный белок IL-22 Fc по п.4, причем аминокислотный остаток в позиции 297 нумерация по EU Fc участка представляет собой Gly, Ala, Gln, Asp или Glu.

6. Химерный белок IL-22 Fc по п. 5, причем причем аминокислотный остаток в позиции 297 нумерация по EU Fc участка представляет собой Gly или Ala.

7. Химерный белок IL-22 Fc по п. 6, причем аминокислотный остаток в позиции 297 нумерация по EU Fc участка представляет собой Gly.

8. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 4-7, причем аминокислотный остаток в позиции 299 нумерация по EU Fc участка представляет собой Ala, Gly или Val.

9. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-8, причем линкер содержит (i) аминокислотную последовательность DKTHT (SEQ ID NO:32) или (ii) аминокислотную последовательность EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40).

10. Химерный белок IL-22 Fc по п. 9, причем (i) линкер составляет в длину по меньшей мере 11 аминокислот и содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33) или (ii) линкер содержит аминокислотную последовательность 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) или KVDKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:65).

11. Химерный белок IL-22 Fc по п. 10, причем линкер содержит аминокислотную последовательность 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) или KVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39).

12. Химерный белок IL-22 Fc по п. 1 или п. 9, причем линкер не содержит аминокислотную последовательность GGS (SEQ ID NO:45).

13. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-12, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

14. Химерный белок IL-22 Fc по п. 13, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 96% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

15. Химерный белок IL-22 Fc по п. 14, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 97% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

16. Химерный белок IL-22 Fc по п. 15, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

17. Химерный белок IL-22 Fc по п. 16, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12.

18. Химерный белок IL-22 Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

19. Химерный белок IL-22 Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

20. Химерный белок IL-22 Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

21. Химерный белок IL-22 Fc, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:20.

22. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп.1-21, полученный согласно способу, включающему этап культивирования клетки-хозяина, способной экспрессировать химерный белок IL-22 Fc, в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка IL-22 Fc.

23. Химерный белок IL-22 Fc по п. 22, причем способ дополнительно включает этап получения химерного белка IL-22 Fc из культуры клеток или культуральной среды.

24. Химерный белок IL-22 Fc по п. 22 или п. 23, причем клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

25. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-24, причем химерный белок IL-22 представляет собой димерный химерный белок IL-22 Fc.

26. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-24, причем химерный белок IL-22 представляет собой мономерный химерный белок IL-22 Fc.

27. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-26, причем полипептид IL-22 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

28. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-27, причем полипептид IL-22 представляет собой полипептид IL-22 человека.

29. Химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-28, причем химерный белок IL-22 Fc связывается с рецептором IL-22.

30. Химерный белок IL-22 Fc по п. 29, причем рецептор IL-22 представляет собой человеческий рецептор IL-22.

31. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-30.

32. Выделенная нуклеиновая кислота по п.31, содержащая полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:19.

33. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по пп. 31 или 32.

34. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 33.

35. Клетка-хозяин по п. 34, причем клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

36. Способ получения химерного белка IL-22 Fc, включающий этап культивирования клетки-хозяина по пп. 34 или 35 в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка IL-22 Fc.

37. Способ по п. 36, дополнительно включающий этап получения химерного белка IL-22 Fc из культуры клеток или культуральной среды.

38. Способ по пп. 36 или 37, в котором клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

39. Применение фармацевтической композиции для лечения, ассоциированного с IL-22 нарушения, содержащей терапевтически эффективное количество химерного белка IL-22 Fc по любому из пп. 1-30 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

40. Применение по п. 39, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

41. Применение по п. 39, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

42. Применение по п. 39, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

43. Применение по любому из пп. 39-42, причем химерный белок IL-22 Fc выработан в клетке CHO.

44. Применение по любому из пп. 39-43, где композиция дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство.

45. Применение фармацевтической композиции для лечения, ассоциированного с IL-22 нарушения, содержащей терапевтически эффективное количество химерного белка IL-22 Fc по любому из пп. 1-30 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, причем фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гелеобразующее средство.

46. Применение по п. 45, причем гелеобразующее средство представляет собой полисахарид или целлюлозное средство, в частности, гелеобразующее средство представляет собой метилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, блок-сополимер POE-POP, альгинат, гиалуроновую кислоту, полиакриловую кислоту, гидроксиэтилметилцеллюлозу или гидроксипропилметилцеллюлозу.

47. Применение по пп. 45 или 46, причем фармацевтическая композиция предназначена для местного нанесения.

48. Применение по любому из пп. 39-47, где ассоциированное с IL-22 нарушение представляет собой IBD.

49. Применение по п. 48, в котором IBD представляет собой язвенный колит.

50. Применение по п. 48, в котором IBD представляет собой болезнь Крона.

51. Применение по любому из пп. 39-47, где ассоциированное с IL-22 нарушение представляет собой микробную инфекцию в кишечнике.

52. Применение по любому из пп. 39-47, где ассоциированное с IL-22 нарушение представляет собой острое повреждение почек или острый панкреатит.

53. Применение по любому из пп. 39-47, где ассоциированное с IL-22 нарушение представляет собой рану.

54. Применение по любому из пп. 39-47, где ассоциированное с IL-22 нарушение представляет собой сердечно-сосудистое состояние, причем состояние включает патологию с формированием атеросклеротических бляшек.

55. Применение по любому из пп. 39-47, где ассоциированное с IL-22 нарушение представляет собой метаболический синдром.

56. Применение по любому из пп. 39-47, где ассоциированное с IL-22 нарушение представляет собой острый эндотоксикоз, сепсис или как первое, так и второе.

57. Способ лечения воспалительного заболевания кишечника (IBD), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-30.

58. Способ лечения IBD, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

59. Способ лечения IBD, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

60. Способ лечения IBD, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

61. Способ по пп. 57-60, в котором IBD представляет собой язвенный колит.

62. Способ по пп. 57-60, в котором IBD представляет собой болезнь Крона.

63. Способ ингибирования микробной инфекции в кишечнике, сохранения бокаловидных клеток в кишечнике при микробной инфекции, повышения целостности эпителиальных клеток, пролиферации эпителиальных клеток, дифференцировки эпителиальных клеток, миграции эпителиальных клеток или заживления эпителиальных ран в кишечнике у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту

терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-30.

64. Способ ингибирования микробной инфекции в кишечнике, сохранения бокаловидных клеток в кишечнике при микробной инфекции, повышения целостности эпителиальных клеток, пролиферации эпителиальных клеток, дифференцировки эпителиальных клеток, миграции эпителиальных клеток или заживления эпителиальных ран в кишечнике у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

65. Способ ингибирования микробной инфекции в кишечнике, сохранения бокаловидных клеток в кишечнике при микробной инфекции, повышения целостности эпителиальных клеток, пролиферации эпителиальных клеток, дифференцировки эпителиальных клеток, миграции эпителиальных клеток или заживления эпителиальных ран в кишечнике у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

66. Способ ингибирования микробной инфекции в кишечнике, сохранения бокаловидных клеток в кишечнике при микробной инфекции, повышения целостности эпителиальных клеток, пролиферации эпителиальных клеток, дифференцировки эпителиальных клеток, миграции эпителиальных клеток или заживления эпителиальных ран в кишечнике у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

67. Способ по любому из пп. 63-66, в котором эпителиальная клетка представляет собой кишечную эпителиальную клетку.

68. Способ лечения острого повреждения почек или острого панкреатита, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-30.

69. Способ лечения острого повреждения почек или острого панкреатита, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

70. Способ лечения острого повреждения почек или острого панкреатита, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

71. Способ лечения острого повреждения почек или острого панкреатита, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

72. Способ по любому из пп. 57-71, в котором субъекту одновременно вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

73. Способ по любому из пп. 57-72, в котором фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно или внутрибрюшинно.

74. Способ ускорения или улучшения заживление ран у субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-30.

75. Способ ускорения или улучшения заживление ран у субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

76. Способ ускорения или улучшения заживление ран у субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

77. Способ ускорения или улучшения заживление ран у субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

78. Способ по любому из пп. 74-77, в котором рана представляет собой хроническую рану или инфицированную рану.

79. Способ по любому из пп. 74-78, в котором субъект страдает сахарным диабетом.

80. Способ по п. 79, в котором страдающий сахарным диабетом субъект имеет сахарный диабет II типа.

81. Способ по пп. 79 или 80, в котором рана представляет собой язву диабетической стопы.

82. Способ по любому из пп. 74-81, в котором фармацевтическую композицию применяют до полного закрытия раны.

83. Способ по любому из пп. 74-82, в котором на субъекте одновременно применяют по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство для ускорения или улучшения заживления ран.

84. Способ по любому из пп. 74-83, в котором фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно или применяют местно.

85. Способ предупреждения или лечения сердечно-сосудистого состояния, причем состояние включает патологию с формированием атеросклеротических бляшек, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-30.

86. Способ предупреждения или лечения сердечно-сосудистого состояния, причем состояние включает патологию с формированием атеросклеротических бляшек, включающий

введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

87. Способ предупреждения или лечения сердечно-сосудистого состояния, причем состояние включает патологию с формированием атеросклеротических бляшек, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

88. Способ предупреждения или лечения сердечно-сосудистого состояния, причем состояние включает патологию с формированием атеросклеротических бляшек, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

89. Способ по любому из пп. 85-88, в котором сердечно-сосудистое состояние выбрано из группы, состоящей из болезни коронарных артерий, коронарного микрососудистого заболевания, инсульта, заболевания сонной артерии, заболевания периферических артерий и хронического заболевания почек.

90. Способ по любому из пп. 85-88, дополнительно включающий замедление прогрессирования формирования атеросклеротических бляшек или предупреждение проявления признака атеросклероза, причем признак атеросклероза, необязательно, включают скопление бляшек или воспаление сосудов.

91. Способ по любому из пп. 85-90, в котором субъекту одновременно вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

92. Способ по любому из пп. 85-91, в котором субъект был выявлен как подверженный риску развития сердечно-сосудистого состояния.

93. Способ по любому из пп. 85-92, в котором фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно или внутрибрюшинно.

94. Способ лечения метаболического синдрома, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-30.

95. Способ лечения метаболического синдрома, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

96. Способ лечения метаболического синдрома, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

97. Способ лечения метаболического синдрома, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

98. Способ по любому из пп. 94-97, дополнительно включающий уменьшение одного или нескольких факторов риска, ассоциированных с метаболическим синдромом, в том числе одного или нескольких из центрального ожирения, гипергликемии, дислипидемии и гипертонии.

99. Способ по любому из пп. 94-98, дополнительно включающий уменьшение уровня бактериального липополисахарида (LPS) у субъекта.

100. Способ по любому из пп. 94-99, в котором субъект нуждается в изменении липидного профиля HDL/LDL.

101. Способ по любому из пп. 94-100, в котором субъекту одновременно вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

102. Способ по любому из пп. 94-101, в котором фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно или внутрибрюшинно.

103. Способ лечения острого эндотоксикоза, сепсиса или как первого, так и второго, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc по любому из пп. 1-30.

104. Способ лечения острого эндотоксикоза, сепсиса или как первого, так и второго, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

105. Способ лечения острого эндотоксикоза, сепсиса или как первого, так и второго, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

106. Способ лечения острого эндотоксикоза, сепсиса или как первого, так и второго, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок IL-22 Fc, причем химерный белок IL-22 Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

107. Способ по любому из пп. 103-106, в котором субъект нуждается в изменении липидного профиля HDL/LDL.

108. Способ по любому из пп. 103-107, в котором субъекту одновременно вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство для лечения острого эндотоксикоза, сепсиса или как первого, так и второго.

109. Способ по любому из пп. 103-108, где фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно или внутрибрюшинно.

110. Способ по любому из пп. 57-109, где фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

111. Способ по любому из пп. 57-109, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят подкожно.

112. Способ по любому из пп. 57-111, в котором субъектом является больной.

113. Способ по любому из пп. 57-112, в котором субъектом является человек.

114. Способ по любому из пп. 74-84, где фармацевтическую композицию применяют местно.

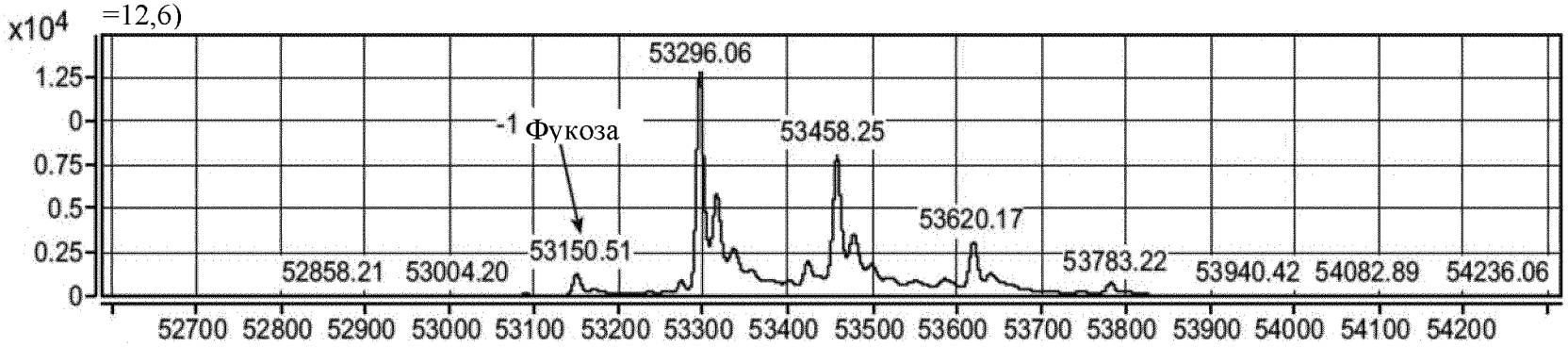
Выравнивание аминокислотных последовательностей IL-22

```
Человек (Q9GZX6)          apisshcrldksnfqqpyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvsmsercylmk  60
Шимпанзе (XP_003313906)   apisshcrldkssfqqpyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvsmsercylmk
Орангутан (XP_002823544)  apisshcrldksnfqqpyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfrgvsmsercylmk
Мышь (Q9JJY9)             lpvntrcklevsnfqqpyivnrtfmlakeasladnntdvrligeklfrgvsakdqcylmk
Собака (XP_538274)        lpisshcrldksnfqqpyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvnmgercylml
                           *    * *  * ****** *************************** **     *****

Человек (Q9GZX6)          qvlnftleevlfpqsdrfqpymqevvpflarlsnrlstchiegddlhiqrnvqklkdtvk  120
Шимпанзе (XP_003313906)   qvlnftleevlfpqsdrfqpymqevvpflarlsnrlstchiegddlhiqrnvqklkdtvk
Орангутан (XP_002823544)  qvlnftleevlfpqsdrfqpymqevvpflarlsnrlstchiegddlhiqrnvqklkdtvk
Мышь (Q9JJY9)             qvlnftledvllpqsdrfqpymqevvpfltklsnqlsschisgddqniqknvrrlketvk
Собака (XP_538274)        evlnftleevllpqsdrfqpymqevvpflarlsnklsqchienddghiqrnvqklkdtvq
                           ******* ** *****************  *** ** ***  **  ** **  ** **

Человек (Q9GZX6)          klgesgeikaigeldllfmslrnaci  146   (SEQ ID NO:4)
Шимпанзе (XP_003313906)   klgengeikaigeldllfmslrnaci        (SEQ ID NO:48)
Орангутан (XP_002823544)  klgesgeikaigeldllfmslrnaci        (SEQ ID NO:49)
Мышь (Q9JJY9)             klgesgeikaigeldllfmslrnacv        (SEQ ID NO:50)
Собака (XP_538274)        klgengeikaigeldllfmalrnacv        (SEQ ID NO:51)
                          **** ************** *****
```

Фиг. 1

Паттерны гикозилирования Fc участка

+ESI Скан (3,612-4,050 мин, 12 сканов) Frag=250,0V PUR31402-30мин LysC.минус деконв. (ширина изотопа =12,6)



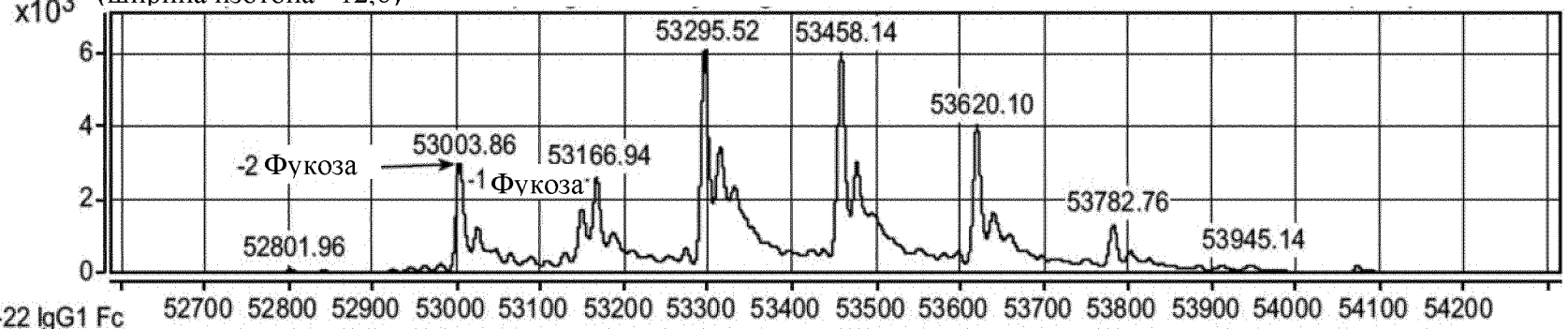
Моноклональный IgG1 Fc

Импульсов относительно Массы после деконволюции (amu)

Фиг. 2A

Паттерны гикозилирования Fc участка

+ESI Скан (3,846-4,045 мин, 6 сканов) Frag=250,0V LysC.расщепление IL-22Fc 30 мин 27183.d минус деконв. (ширина изотопа =12,6)



IL-22 IgG1 Fc
EPKSCDKTHT
(SEQ ID NO:33)

Импульсов относительно Массы после деконволюции (amu)

Фиг. 2B

Паттерны гикозилирования Fc участка
+ESI скан (3,803-4,002 мин, 6 сканов) Frag=250,0V LysC.расщепление IL-22Fc 30 мин 27182.d минус деконв.
(ширина изотопа =12,6)

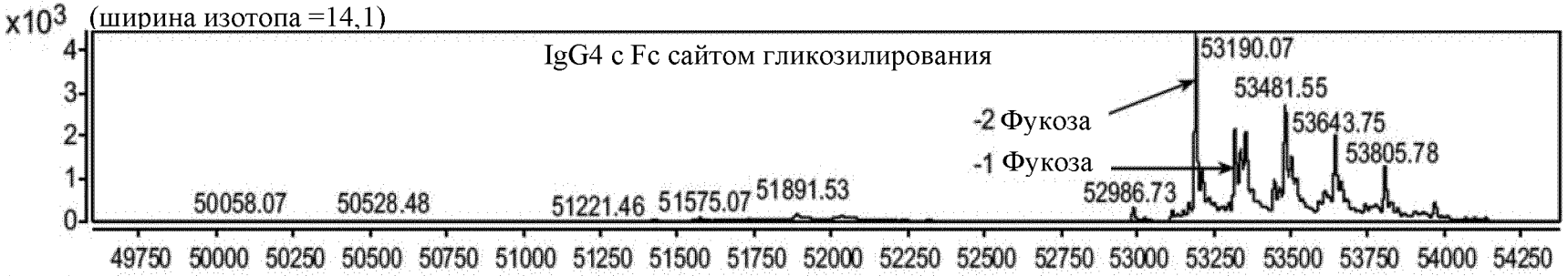
Фиг. 2C

Паттерны гикозилирования Fc участка
+ESI скан (3,849-4,048 мин, 6 сканов) Frag=250,0V LysC.расщепление IL-22Fc 30 мин 25146.d минус деконв.
(ширина изотопа =12,6)

Фиг. 2D

Паттерны гикозилирования Fc участка

+ESI скан (14,184-14,794 мин, 39 сканов) Frag=200,0V IL-22Fc REQ 29827 триптический расщепление.d минус деконв. (ширина изотопа =14,1)

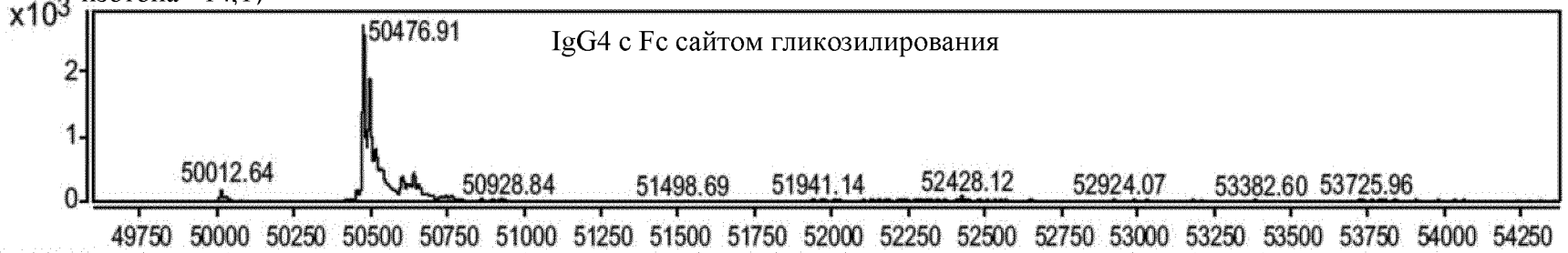


IL-22 IgG4 Fc
RVESKYGPP
(SEQ ID NO:44)

Фиг. 2E

Паттерны гикозилирования Fc участка

+ESI скан (14,854-15,448 мин, 38 сканов) Frag=200,0V REQ32436 IL22-Fc IgG4 расщепление.d минус деконв. (ширина изотопа =14,1)

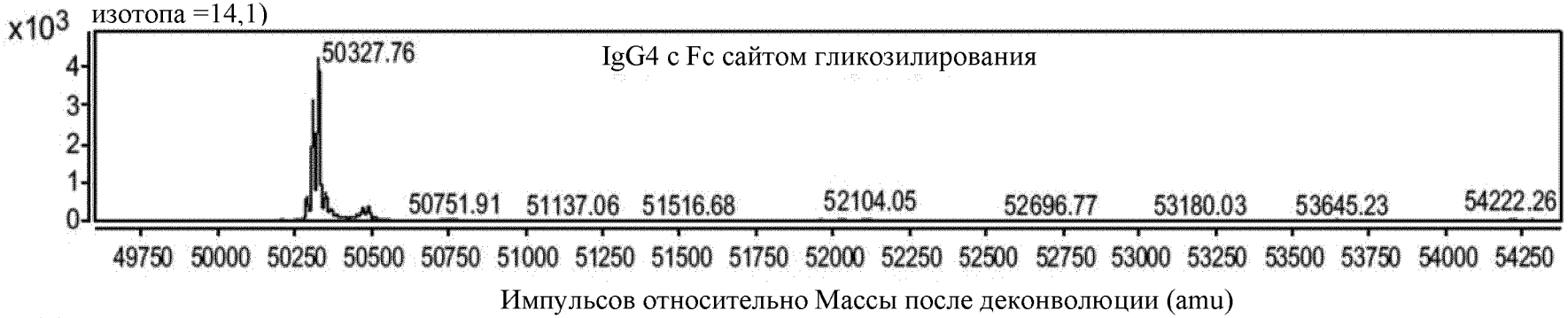


IL-22 IgG4 Fc
N297G
RVESKYGPP
(SEQ ID NO:44)

Фиг. 2F

Паттерны гикозилирования Fc участка

+ESI скан (3,178-3,566 мин, 25 сканов) Frag=250,0V PUR37291 IL-22Fc lys C расщепление.d минус деконв. (ширина изотопа =14,1)



IL-22 IgG1 Fc
N297G
EPKSSDKTHT
(SEQ ID NO:40)

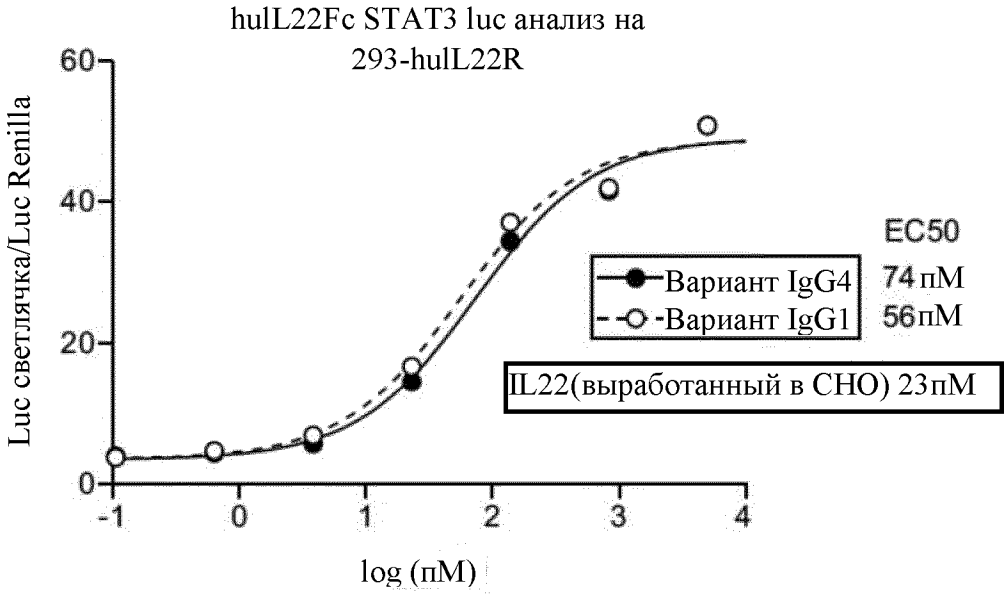
Фиг. 2G

Фиг. 3

[Зрелый N-концевой IL-22

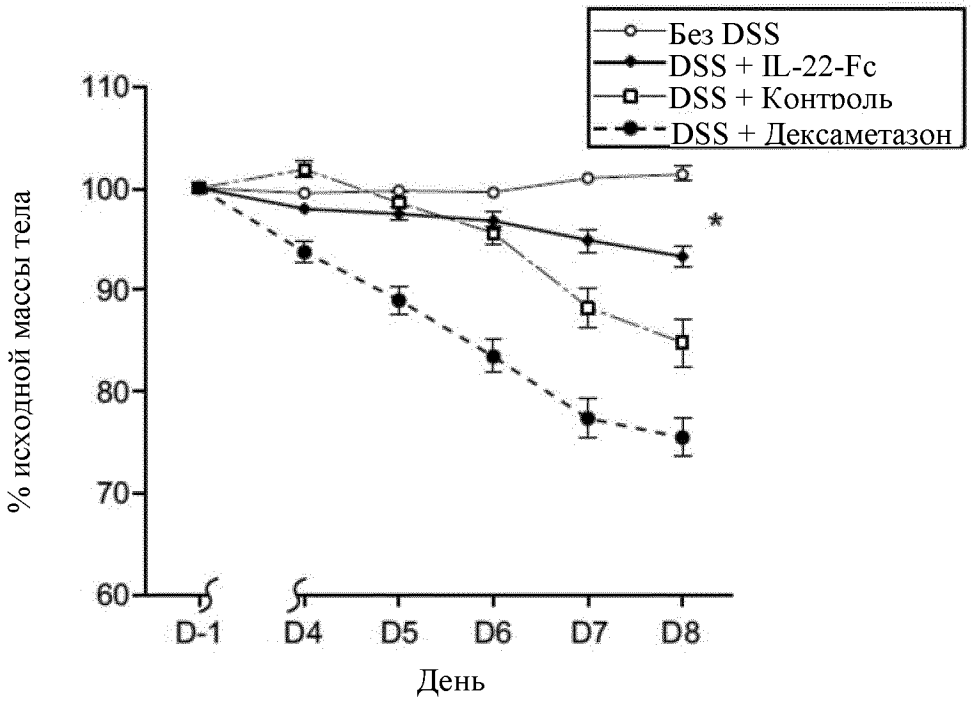
```
IL-22 IgG4 Fc   APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGV   50
IL-22 IgG1 Fc   APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGV   50
IL-22           APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGV   50

IL-22 IgG4 Fc   SMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCH   100
IL-22 IgG1 Fc   SMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCH   100
IL-22           SMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCH   100
                                                  C-конец][Линкер
IL-22 IgG4 Fc   IEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIRVES   150
IL-22 IgG1 Fc   IEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIEPKS   150
IL-22           IEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI (SEQ ID NO:4)   146
                     ][Fc
IL-22 IgG4 Fc   K-YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE   199
IL-22 IgG1 Fc   SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE   200
                                          N297G
IL-22 IgG4 Fc   DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY   249
IL-22 IgG1 Fc   DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY   250

IL-22 IgG4 Fc   KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV   299
IL-22 IgG1 Fc   KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV   300

IL-22 IgG4 Fc   KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE   349
IL-22 IgG1 Fc   KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ   350
                                            ]
IL-22 IgG4 Fc   GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:8)   377
IL-22 IgG1 Fc   GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:20/SEQ ID NO:12)   378
```

IL-22 Fc IgG1 и IgG4 имеют сходную активность in Vitro



Фиг. 4

Терапевтические эффекты IL-22 Fc в DSS модели IBD

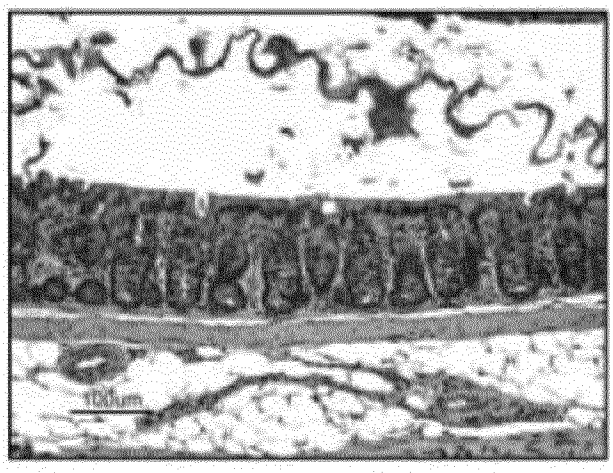


Фиг. 5А

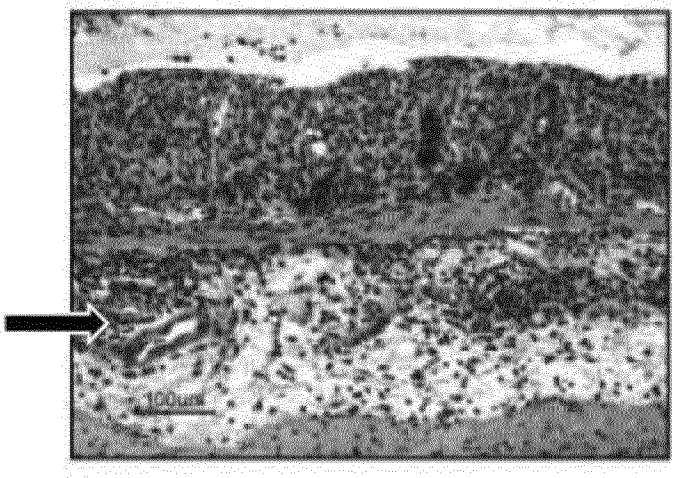
Фиг. 5B

Терапевтические эффекты IL-22 Fc в DSS модели IBD

Без DSS



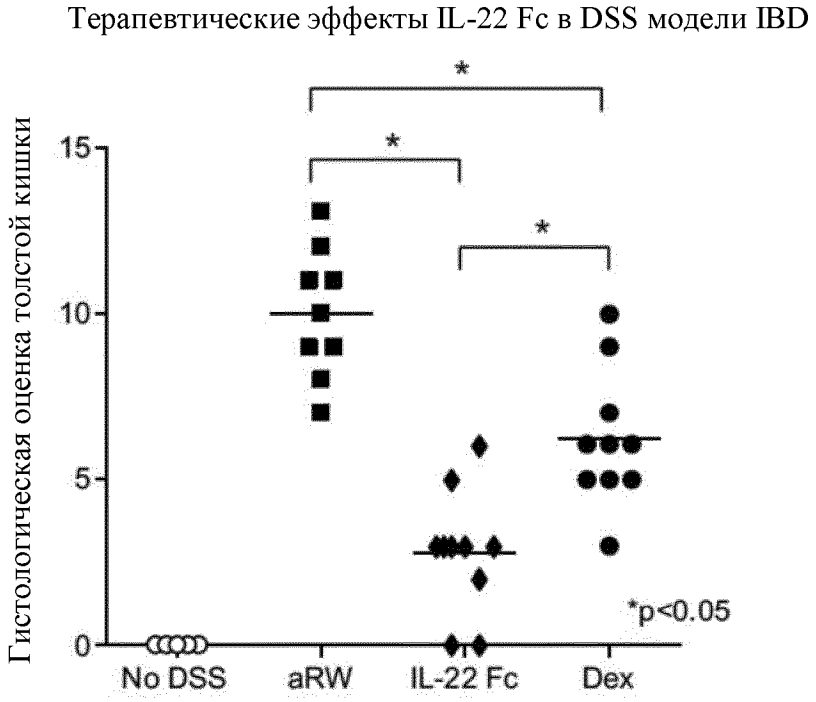
DSS + Контроль

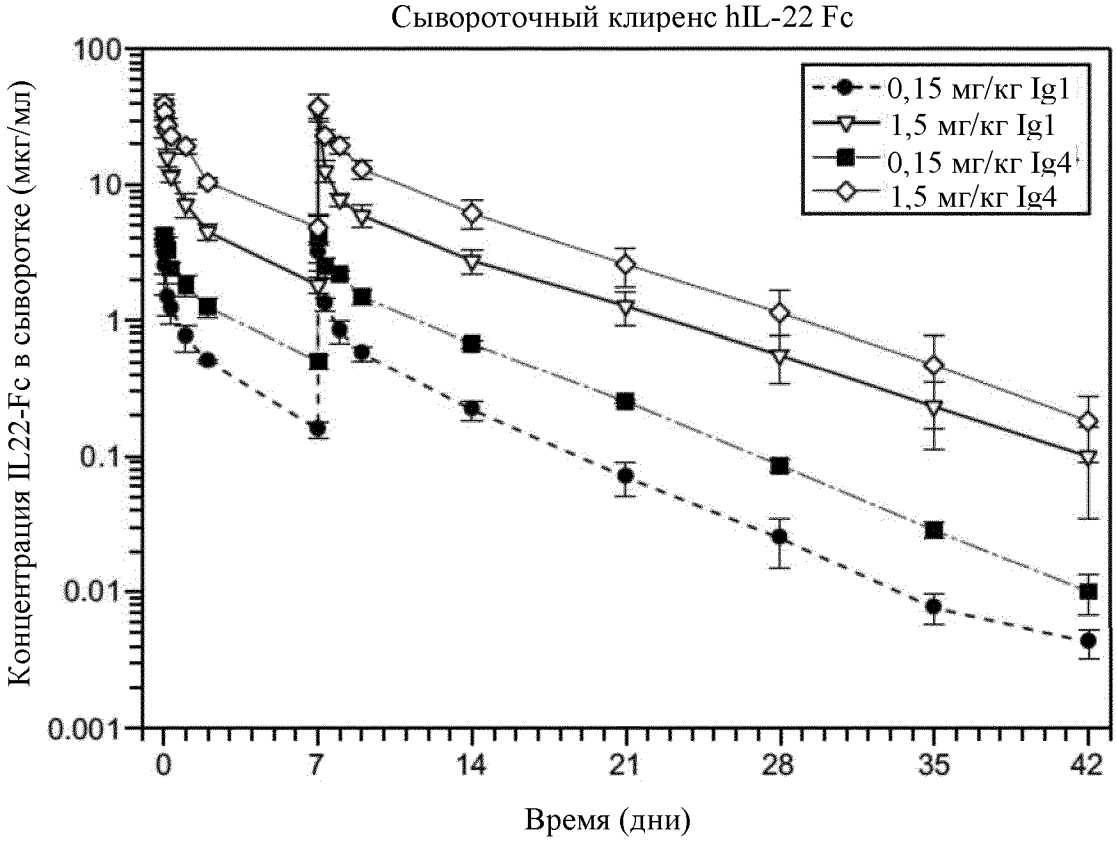


DSS + IL-22-Fc

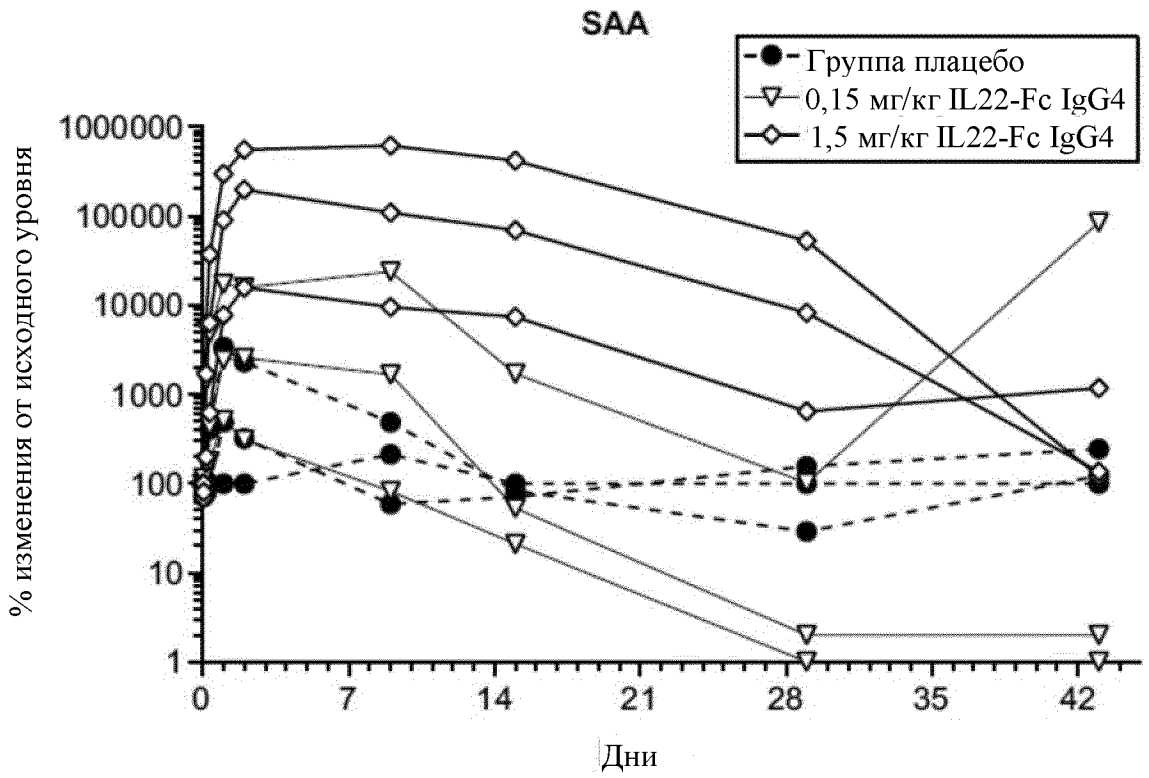
Уменьшенное воспаление

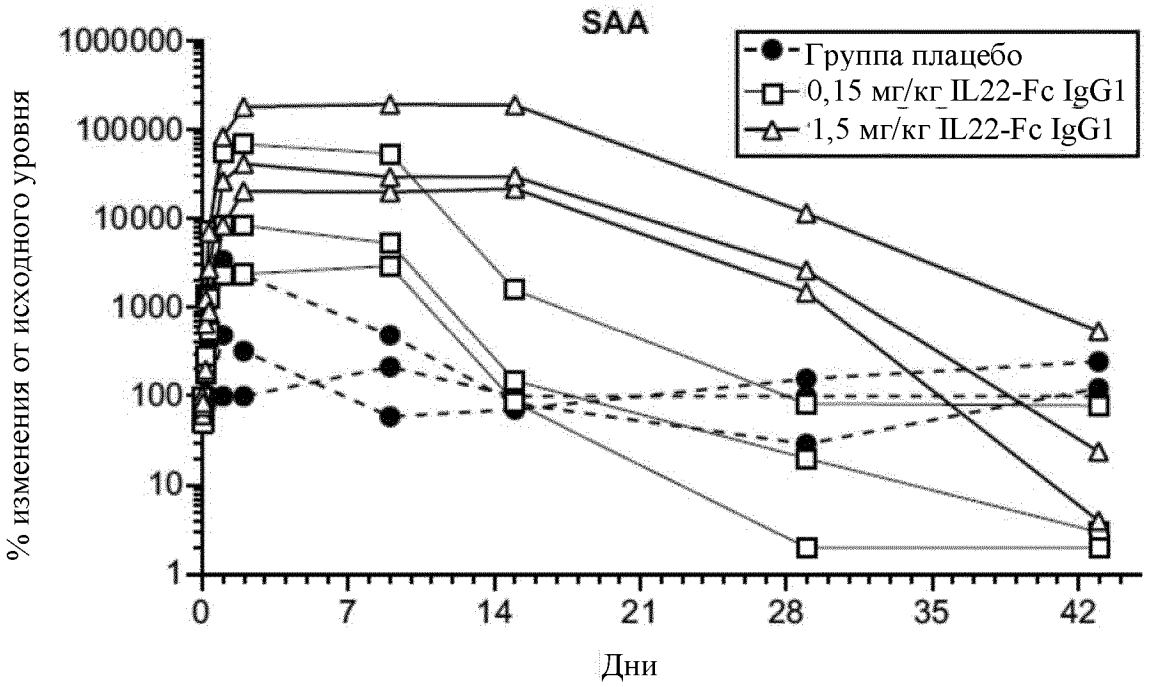
Фиг. 5C


Терапевтические эффекты IL-22 Fc в DSS модели IBD
Гистологическая оценка толстой кишки
15
10
5
0
*
*
*
*p<0.05
No DSS
aRW
IL-22 Fc
Dex

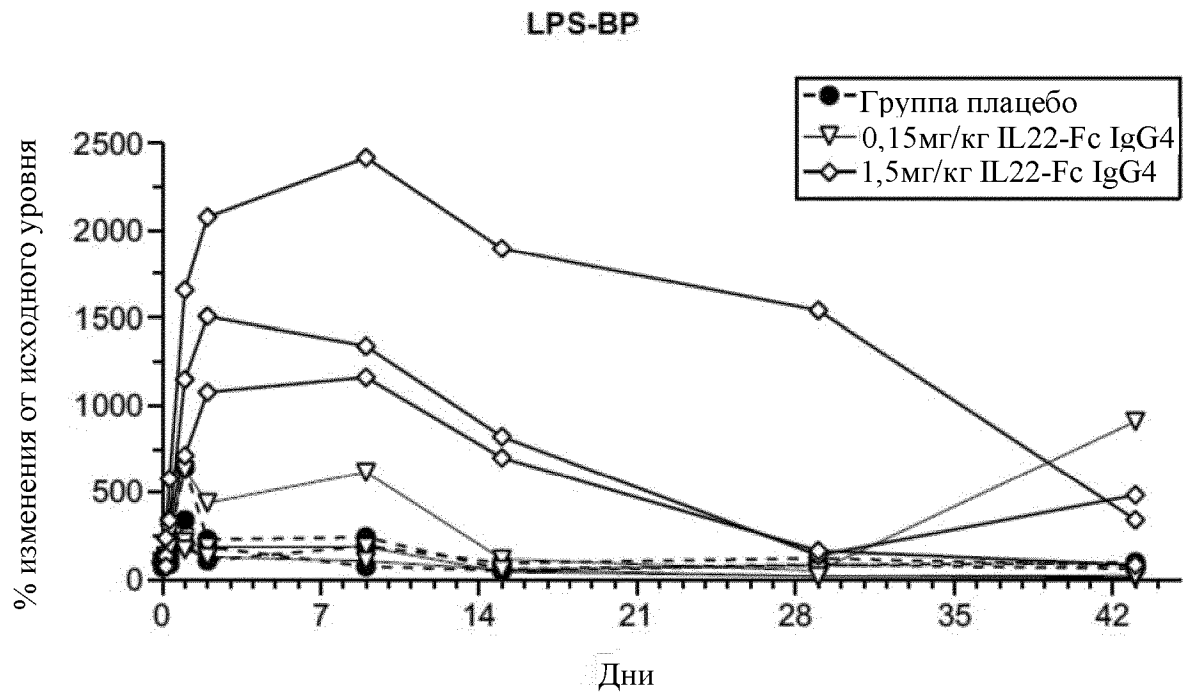

Сывороточный клиренс hIL-22 Fc
Концентрация IL22-Fc в сыворотке (мкг/мл)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0,15 мг/кг Ig1
1,5 мг/кг Ig1
0,15 мг/кг Ig4
1,5 мг/кг Ig4
0
7
14
21
28
35
42
Время (дни)

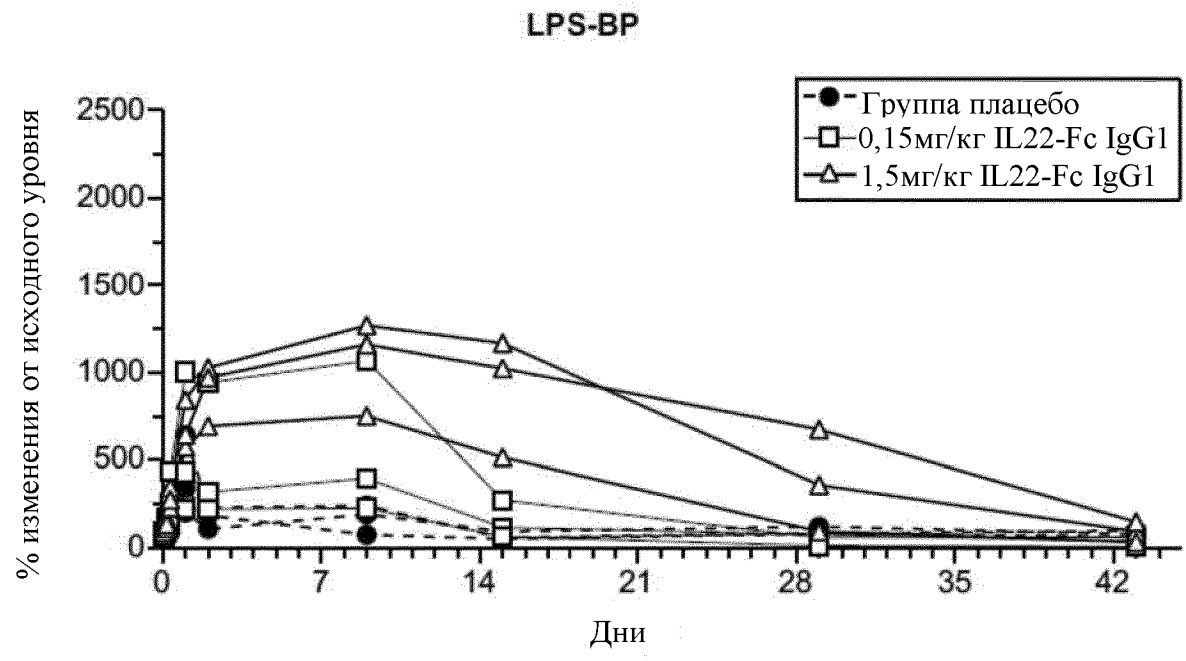
Фиг. 6


SAA
Группа плацебо
0,15 мг/кг IL22-Fc IgG4
1,5 мг/кг IL22-Fc IgG4
% изменения от исходного уровня
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
Дни

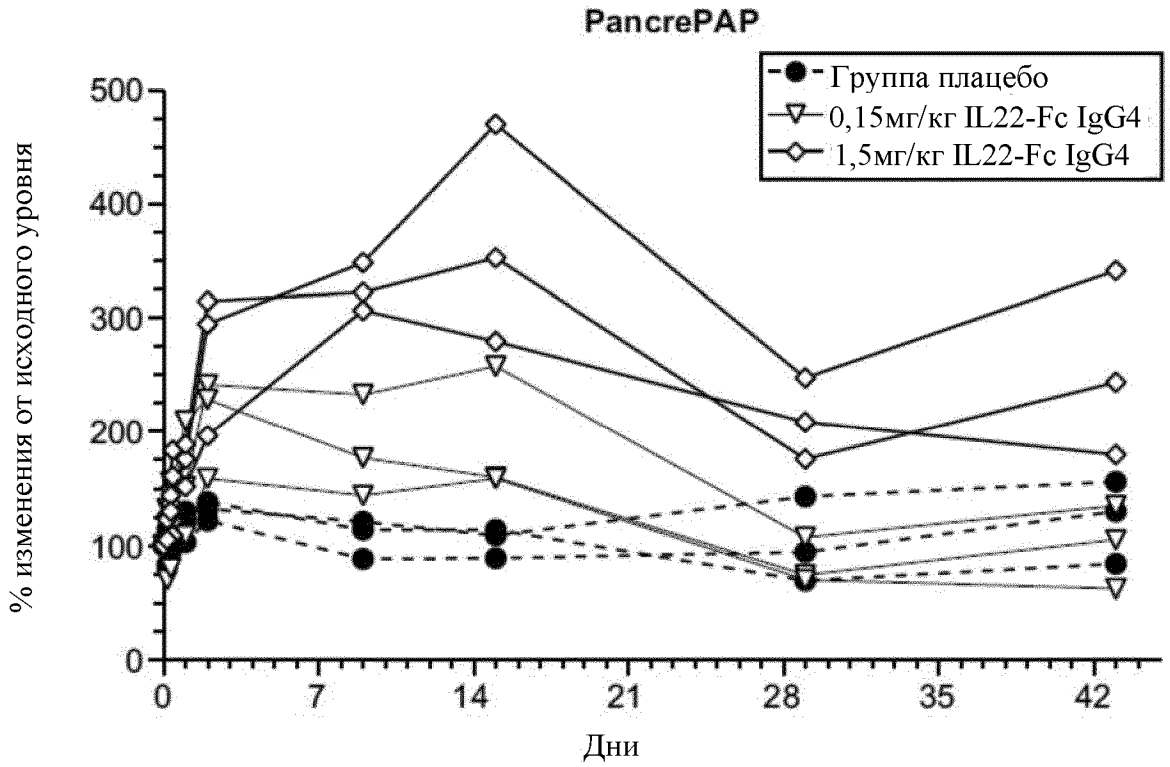

SAA
Группа плацебо
0,15 мг/кг IL22-Fc IgG1
1,5 мг/кг IL22-Fc IgG1
% изменения от исходного уровня
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
Дни

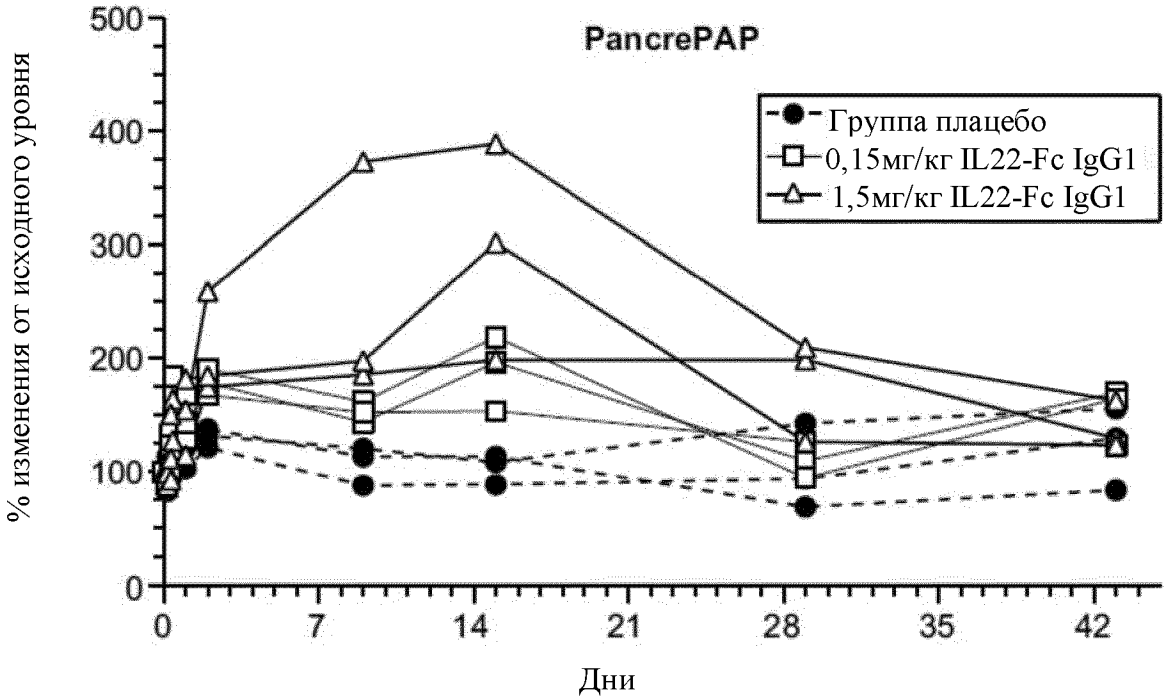
Фиг. 7А


LPS-BP
Группа плацебо
0,15мг/кг IL22-Fc IgG4
1,5мг/кг IL22-Fc IgG4
% изменения от исходного уровня
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
Дни

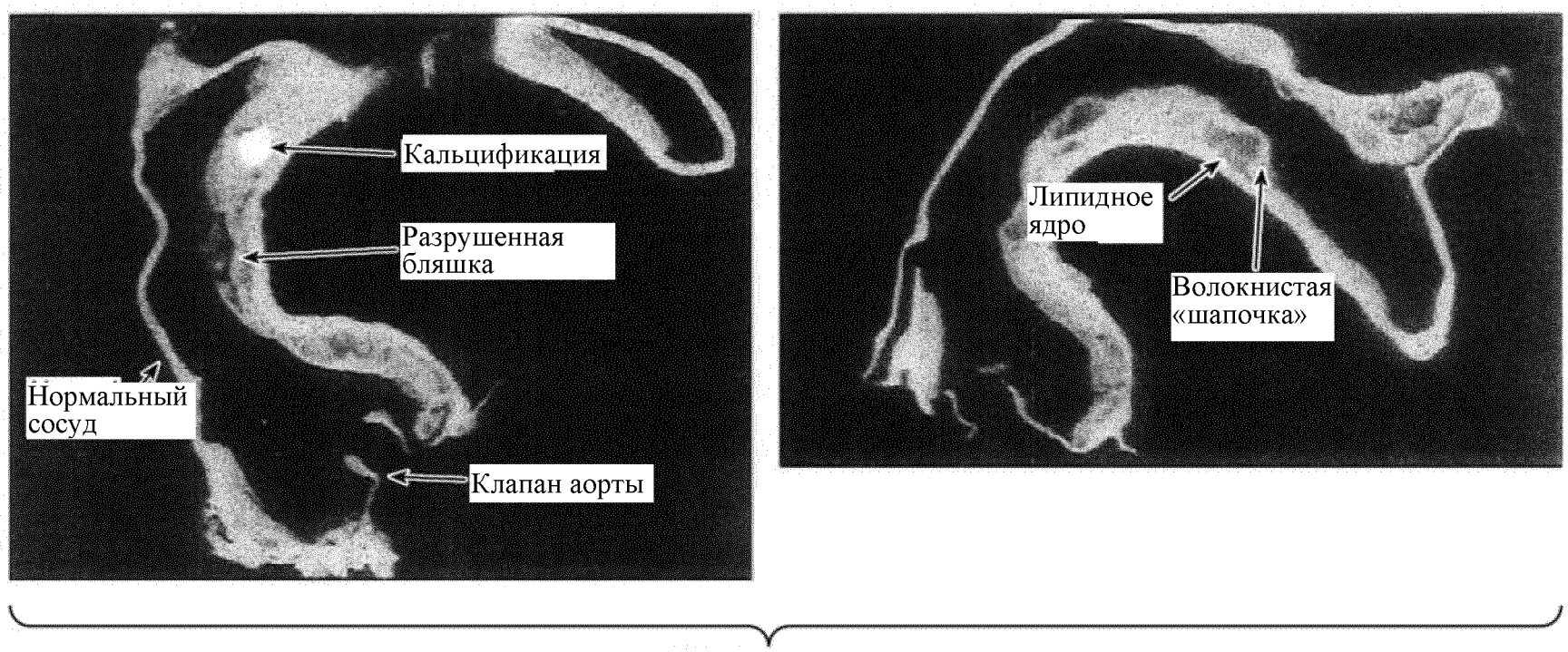

LPS-BP
Группа плацебо
0,15мг/кг IL22-Fc IgG1
1,5мг/кг IL22-Fc IgG1
% изменения от исходного уровня
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
Дни

Фиг. 7B

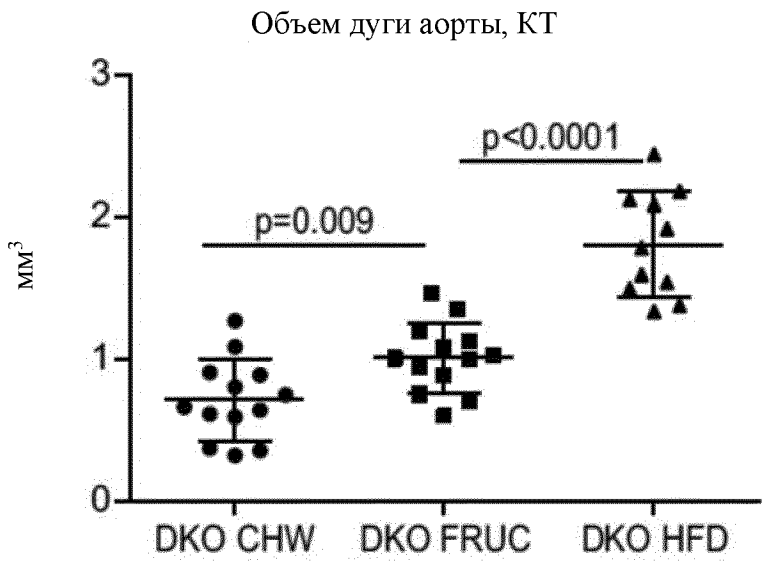

PancrePAP
Группа плацебо
0,15мг/кг IL22-Fc IgG4
1,5мг/кг IL22-Fc IgG4
% изменения от исходного уровня
500
400
300
200
100
0
0
7
14
21
28
35
42
Дни


PancrePAP
Группа плацебо
0,15мг/кг IL22-Fc IgG1
1,5мг/кг IL22-Fc IgG1
% изменения от исходного уровня
500
400
300
200
100
0
0
7
14
21
28
35
42
Дни

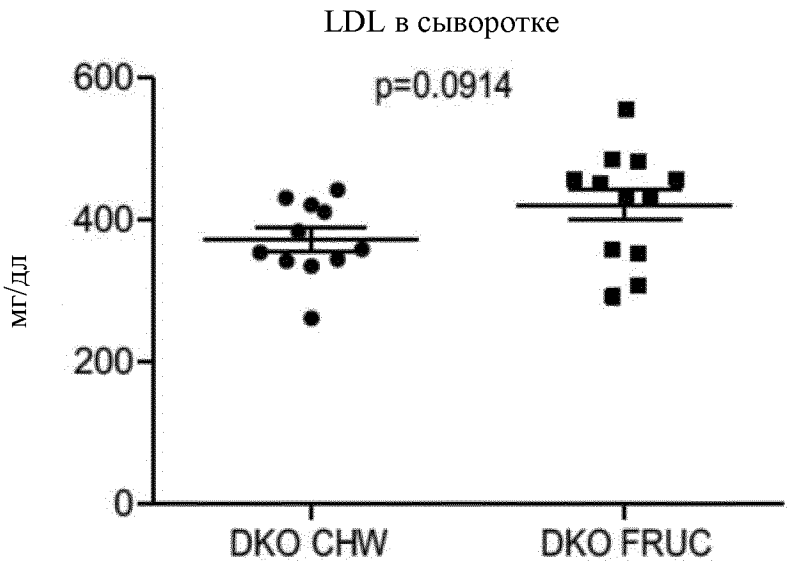
Фиг. 7C


Кальцификация
Разрушенная бляшка
Нормальный сосуд
Клапан аорты
Липидное ядро
Волокнистая «шапочка»

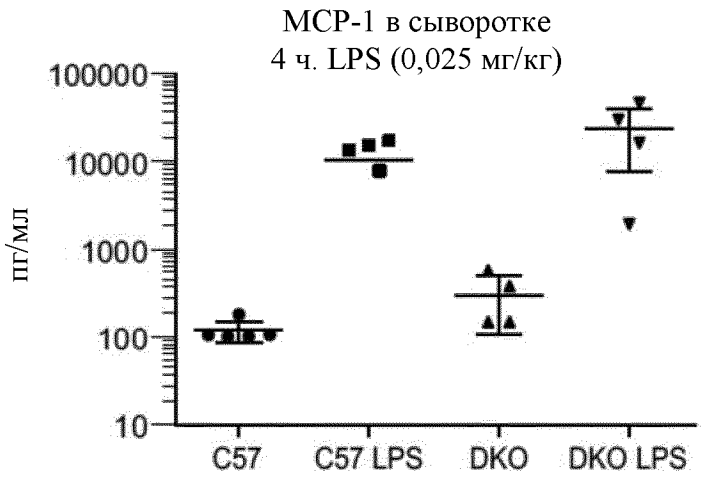
Фиг. 8


Объем дуги аорты, КТ
мм3
3
2
1
0
p=0.009
p<0.0001
DKO CHW
DKO FRUC
DKO HFD

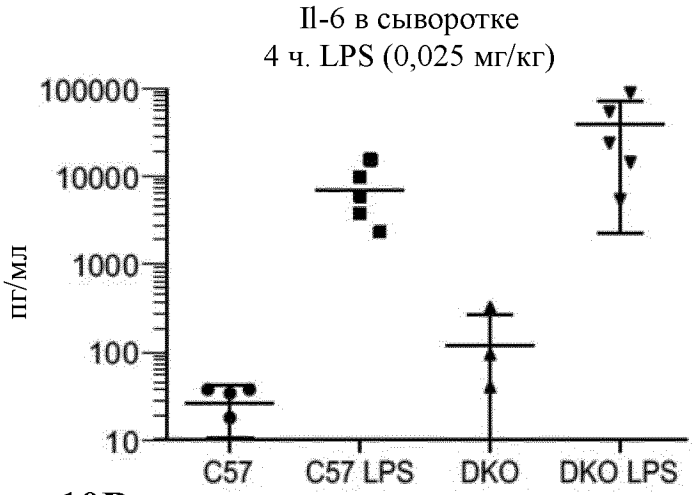
Фиг. 9A


LDL в сыворотке
мг/дл
600
400
200
0
p=0.0914
DKO CHW
DKO FRUC

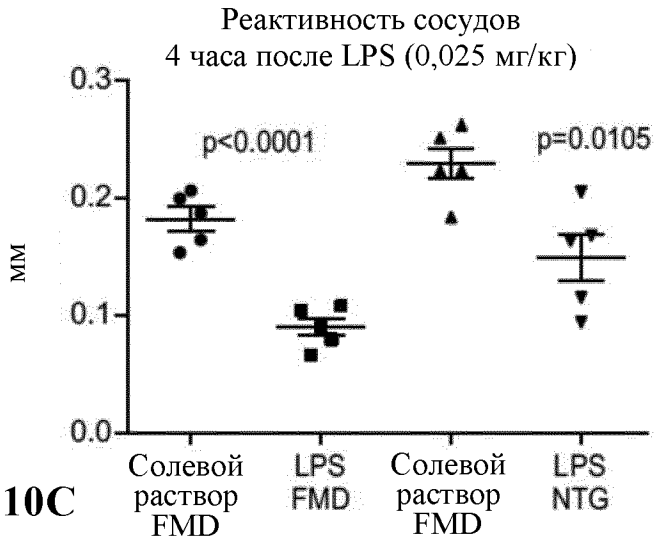
Фиг. 9B



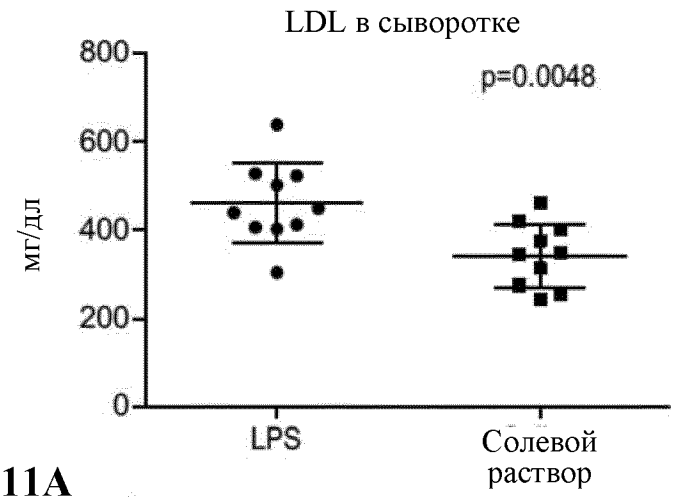
Фиг. 10A



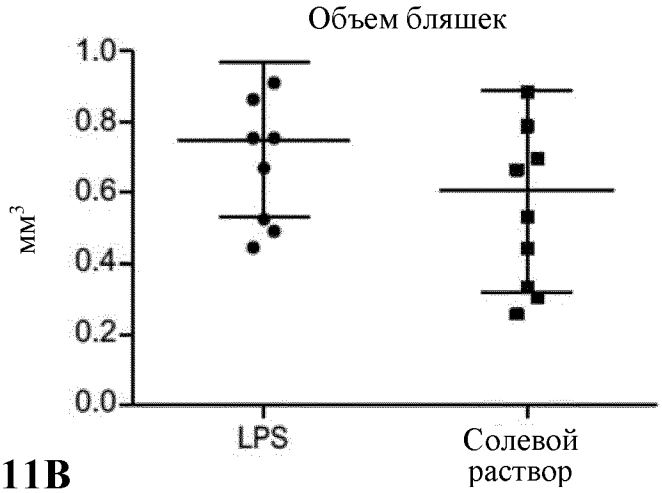
Фиг. 10B



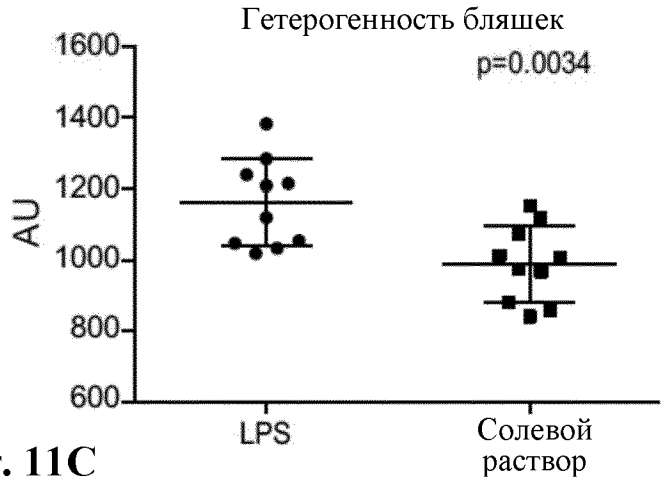
Фиг. 10C



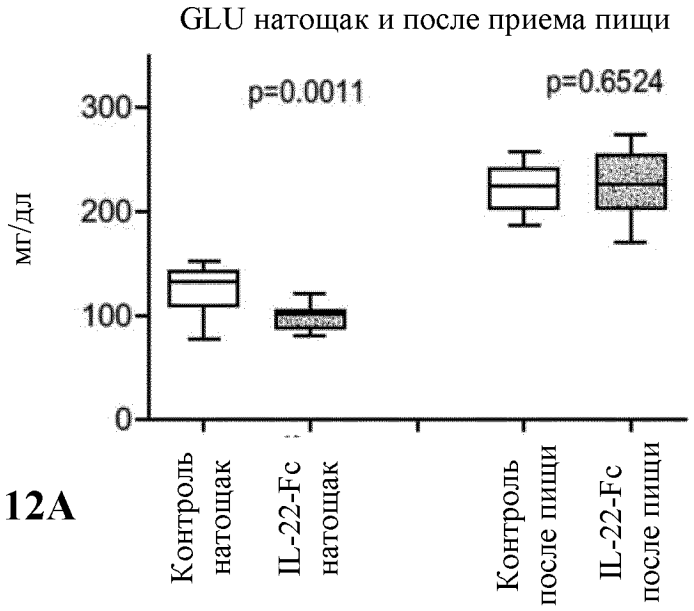
Фиг. 11A



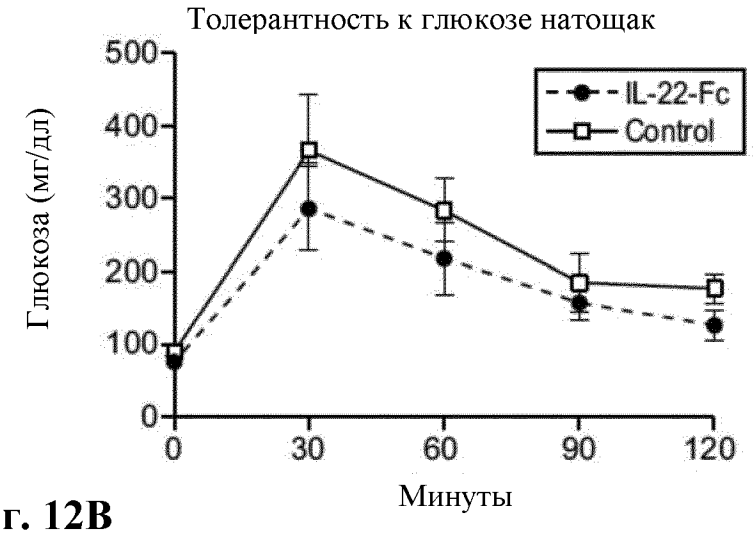
Фиг. 11B



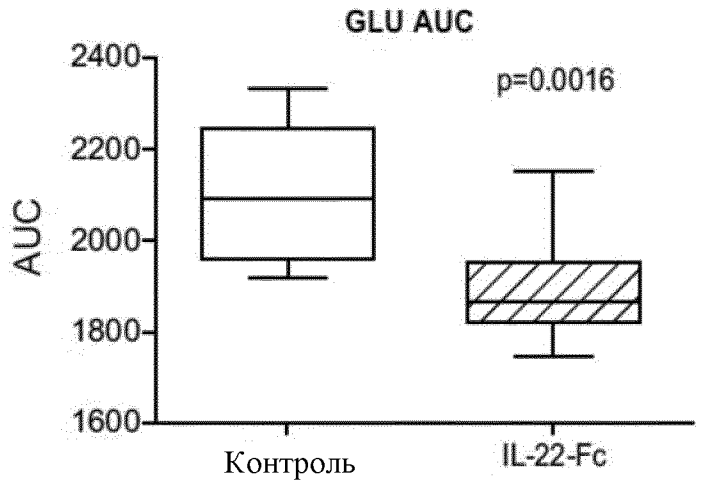
Фиг. 11C



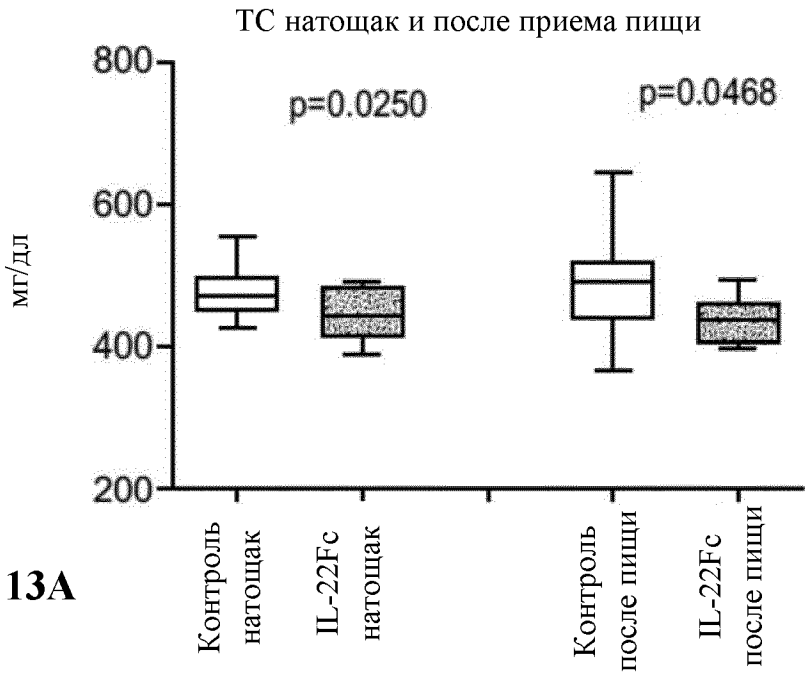
Фиг. 12A



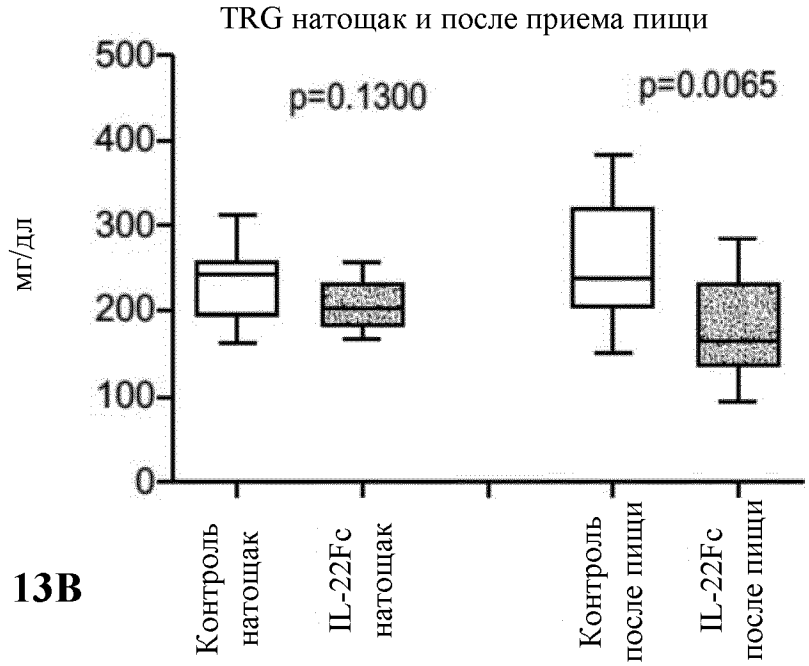
Фиг. 12B



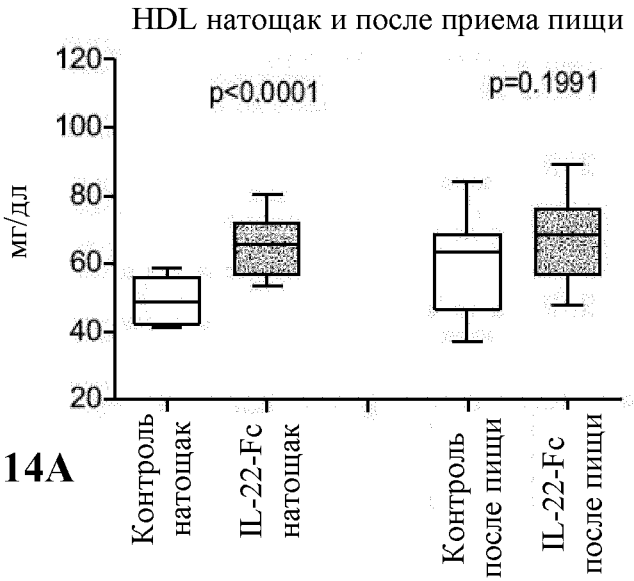
Фиг. 12C



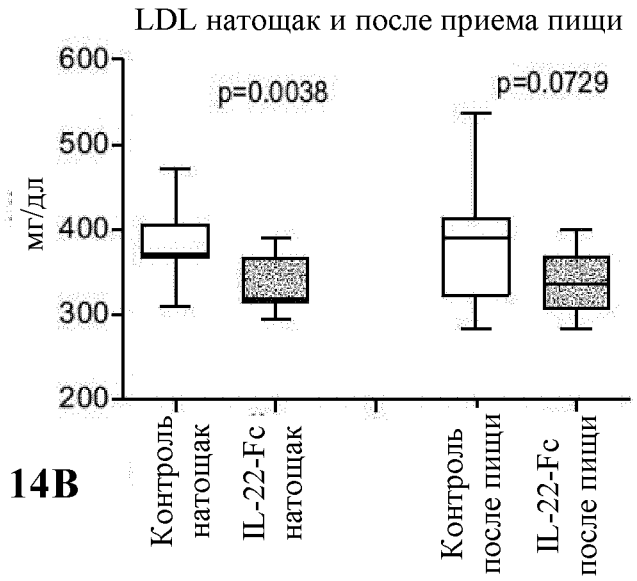
Фиг. 13A



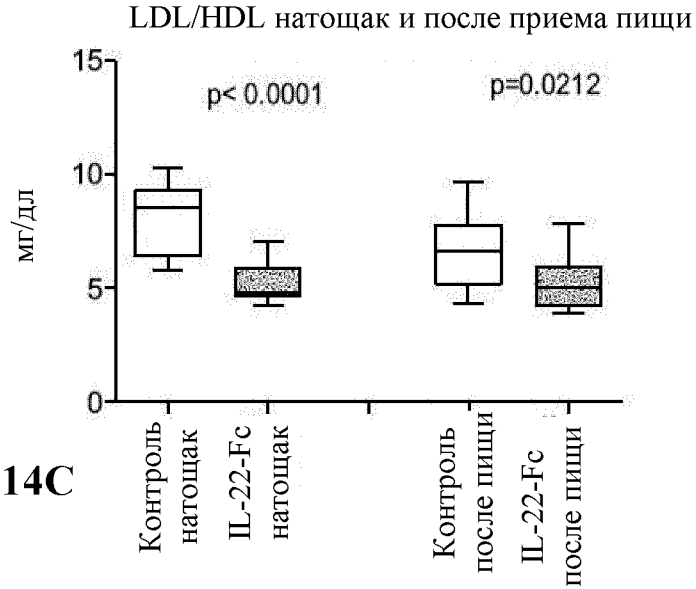
Фиг. 13B



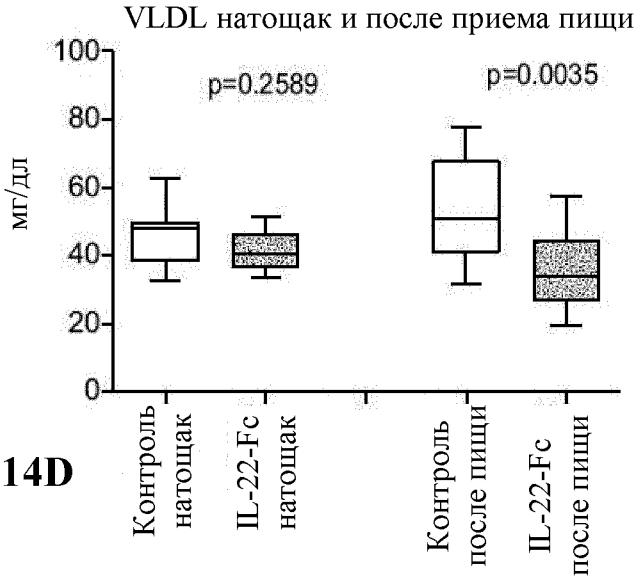
Фиг. 14A



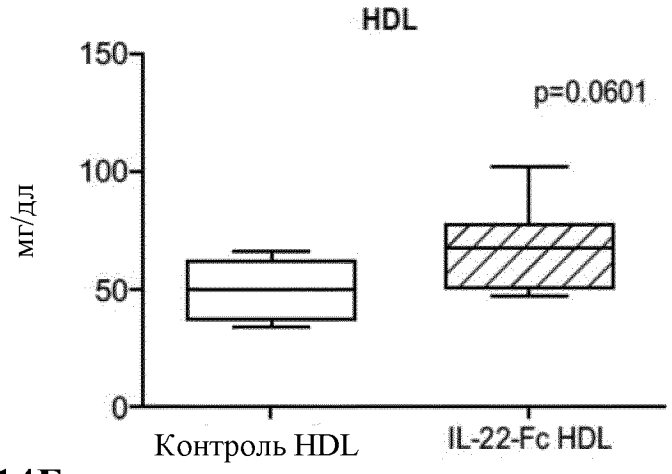
Фиг. 14B



Фиг. 14C

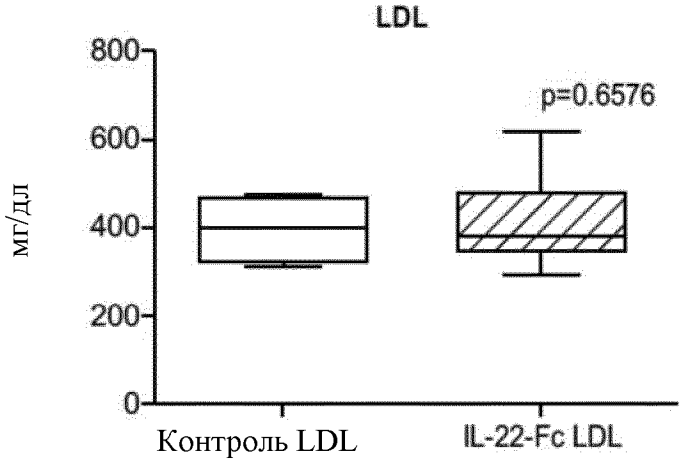


Фиг. 14D



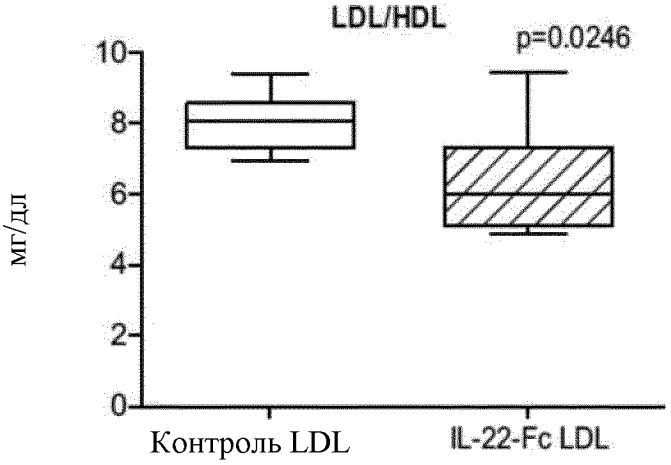
Фиг. 14E

5 дней (две дозы)



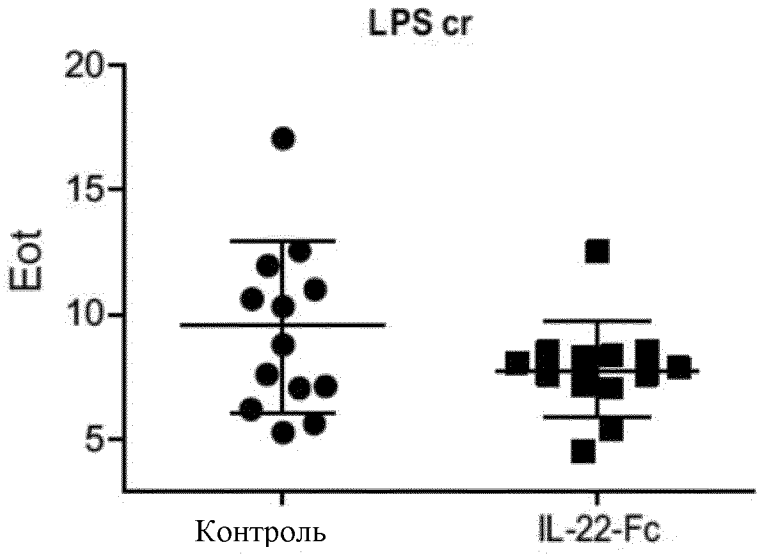
Фиг. 14F

5 дней (две дозы)

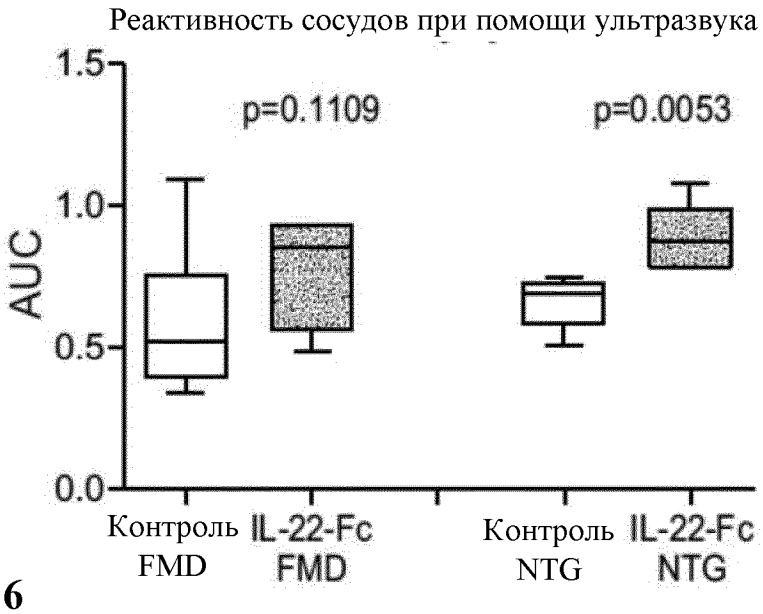


Фиг. 14G

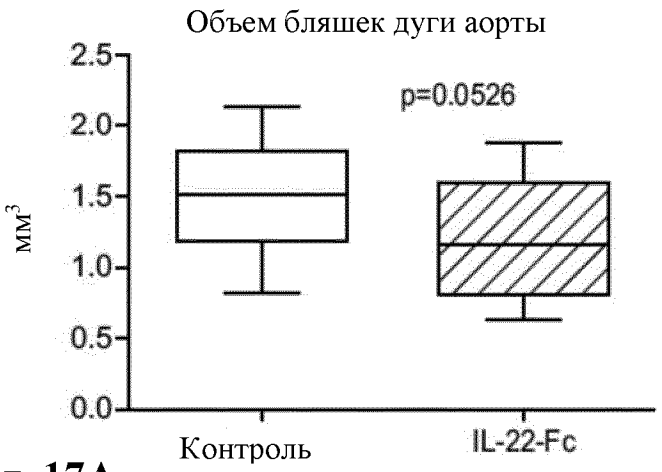
5 дней (две дозы)


LPS cr
Eot
20
15
10
5
Контроль
IL-22-Fc

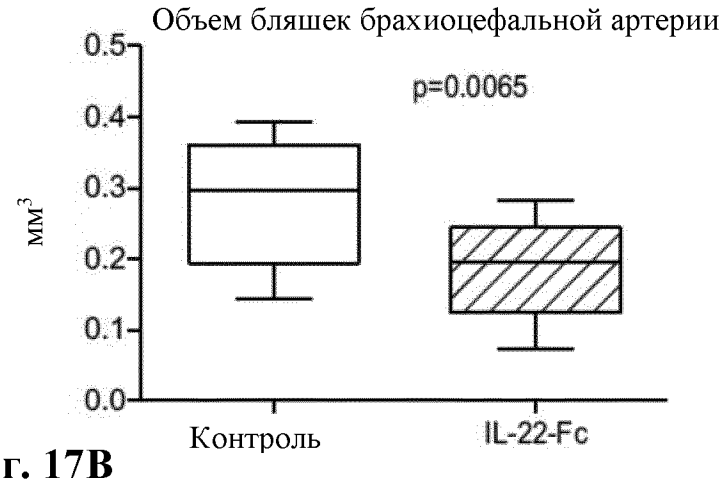
Фиг. 15


Реактивность сосудов при помощи ультразвука
AUC
1.5
1.0
0.5
0.0
p=0.1109
p=0.0053
Контроль FMD
IL-22-Fc FMD
Контроль NTG
IL-22-Fc NTG

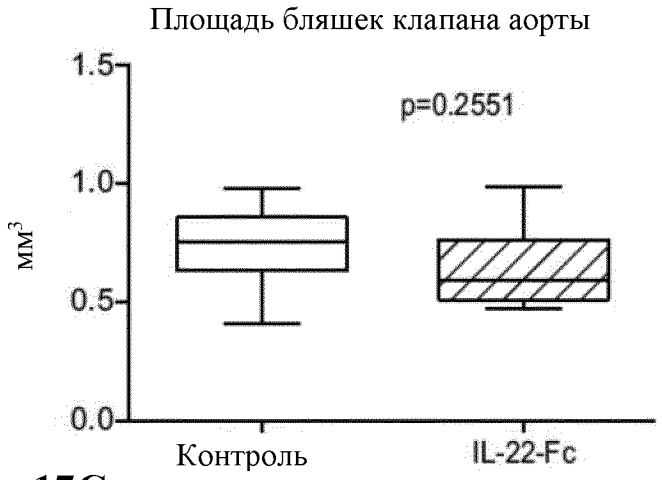
Фиг. 16



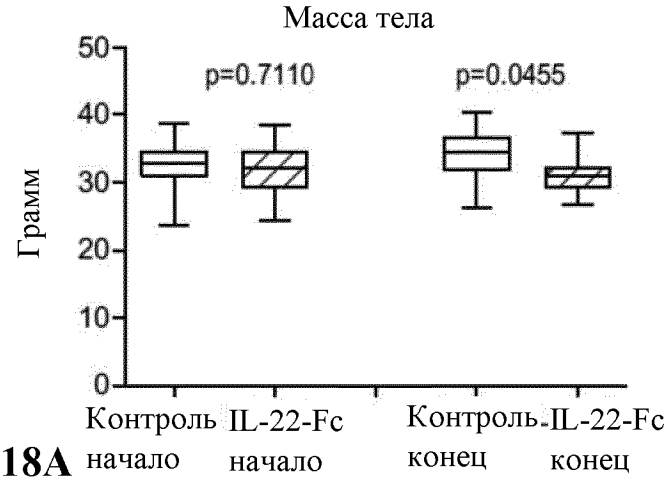
Фиг. 17A



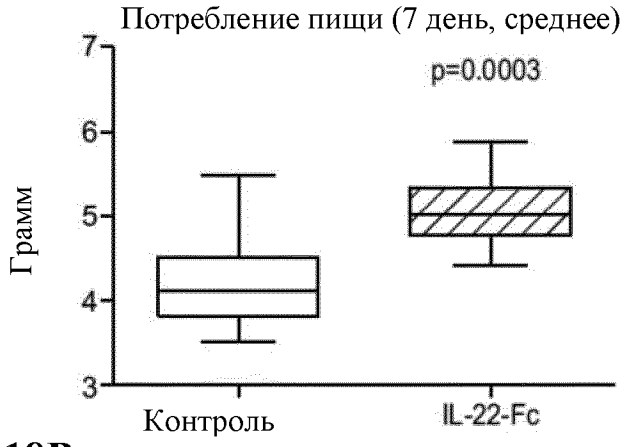
Фиг. 17B



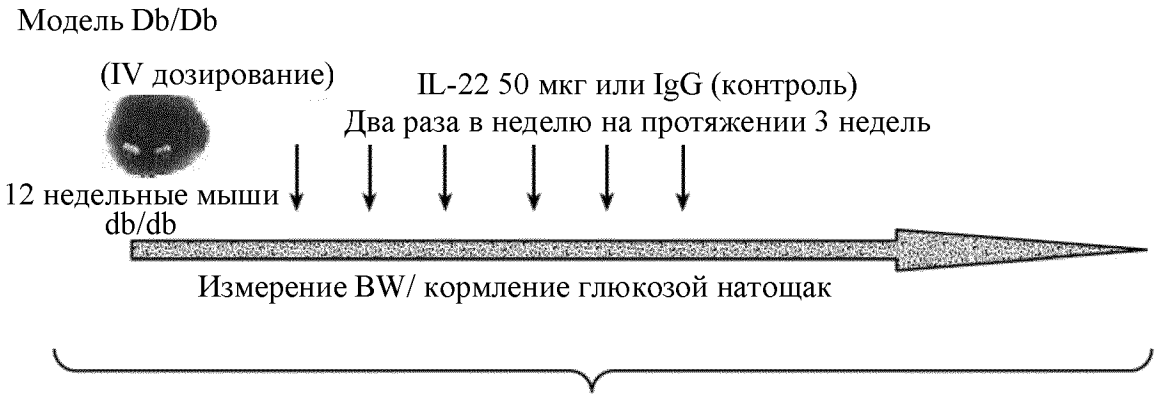
Фиг. 17C



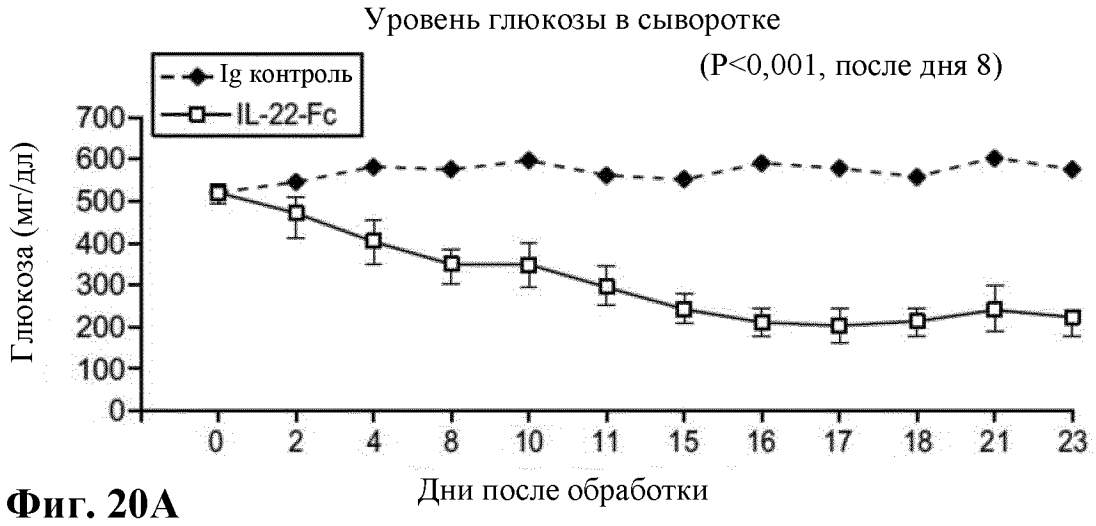
Фиг. 18A



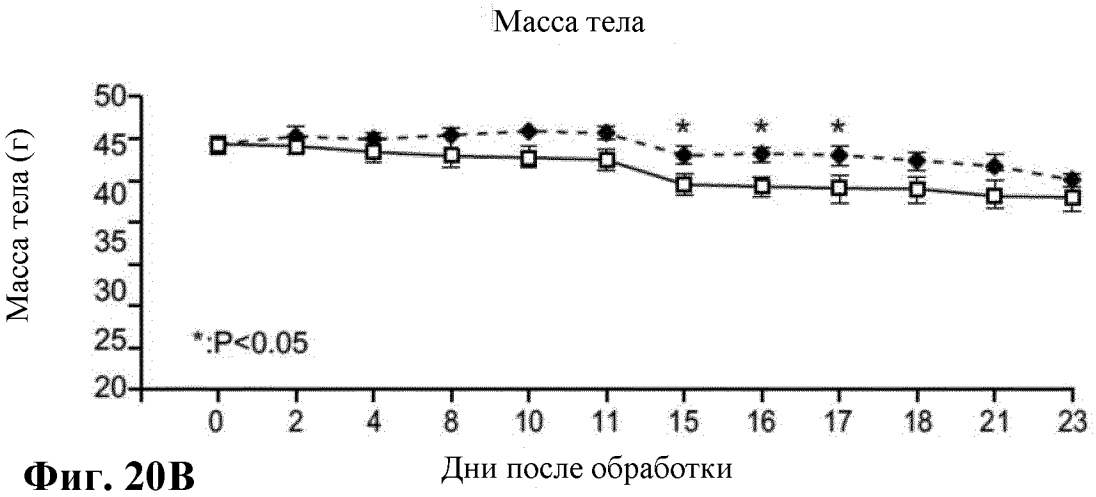
Фиг. 18B



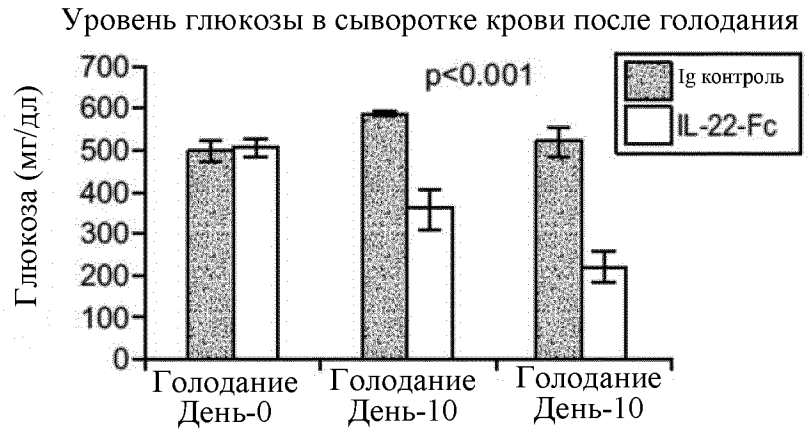
Фиг. 19



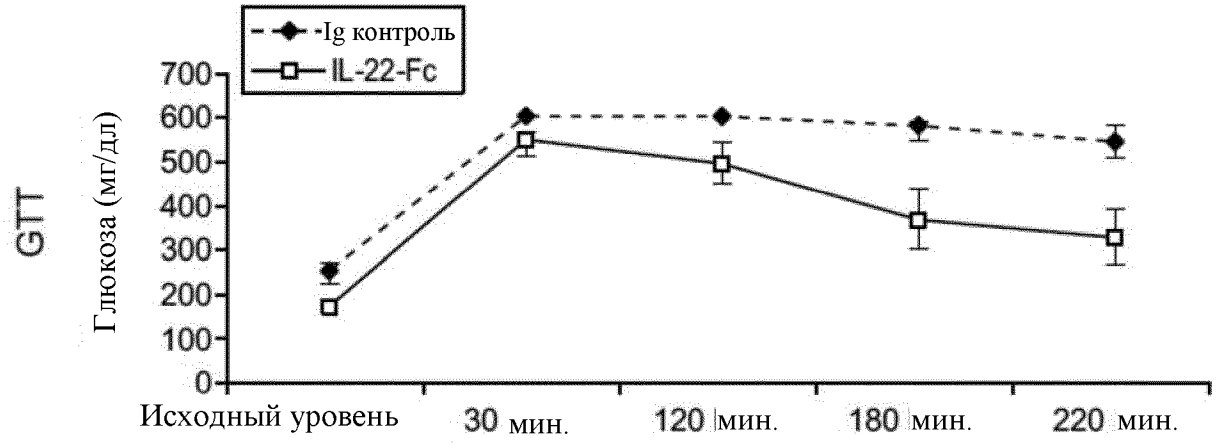
Фиг. 20A



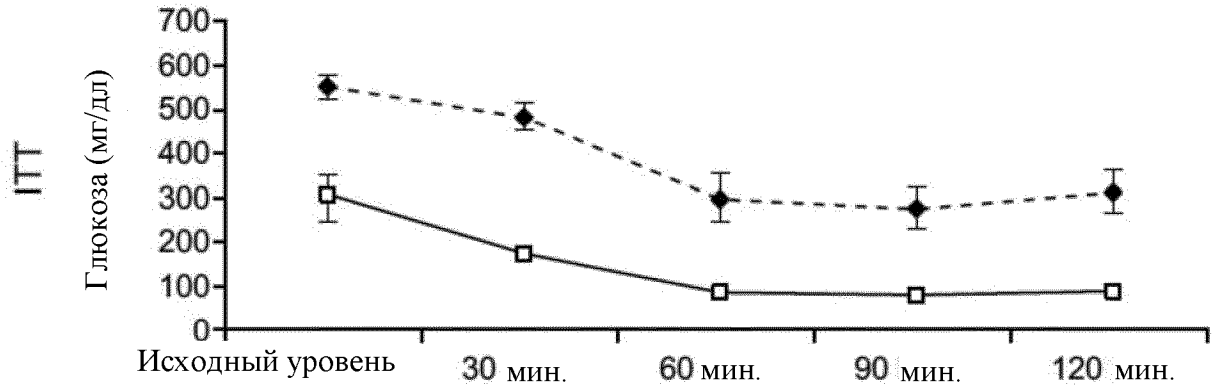
Фиг. 20B



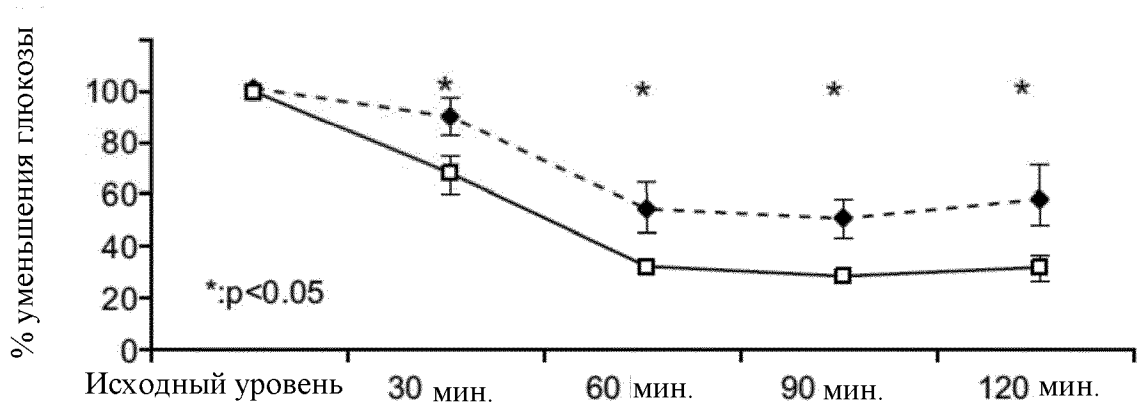
Фиг. 20C



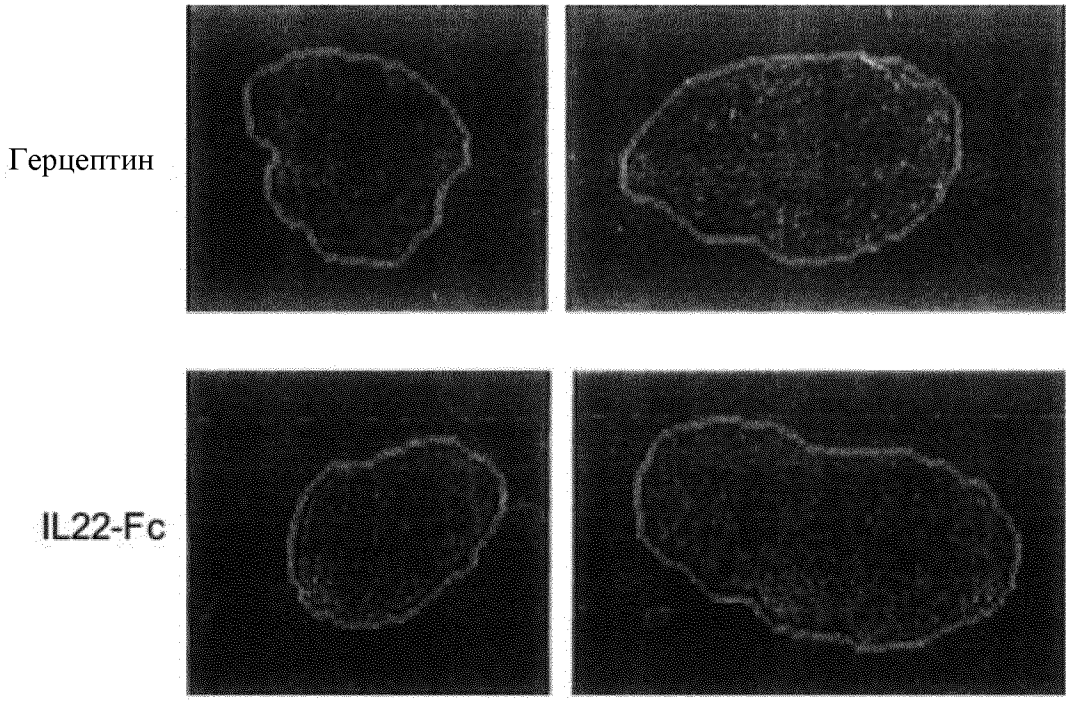
Фиг. 21



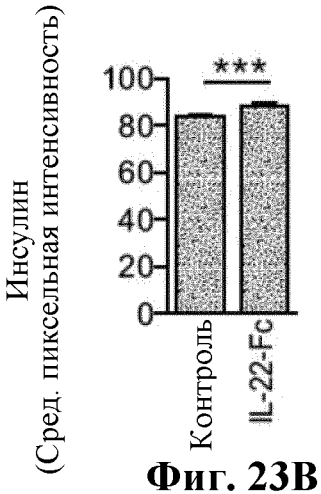
Фиг. 22A



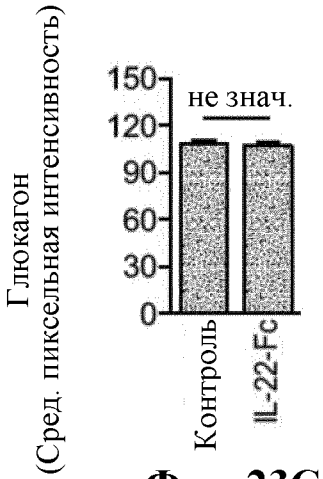
Фиг. 22B



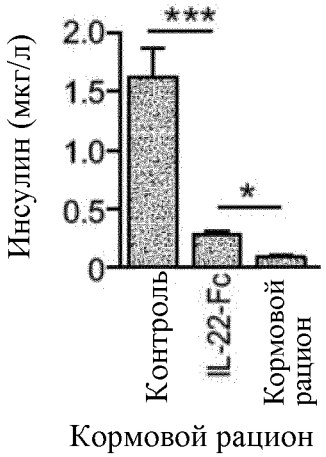
Фиг. 23A



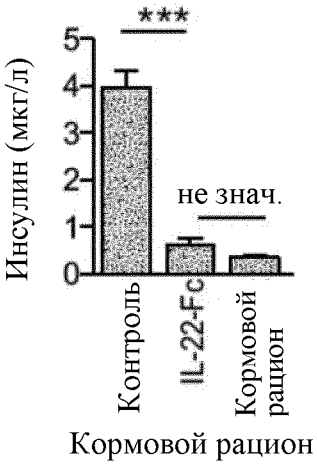
Фиг. 23B



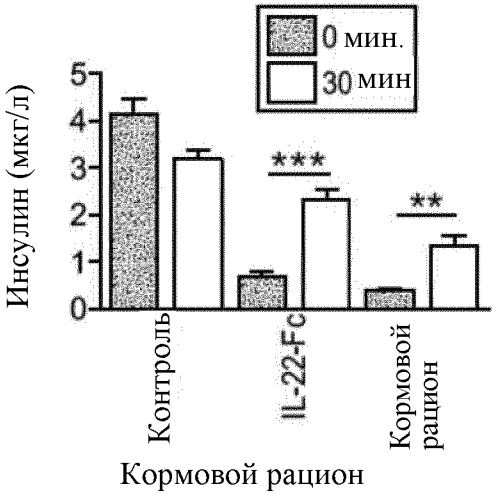
Фиг. 23C



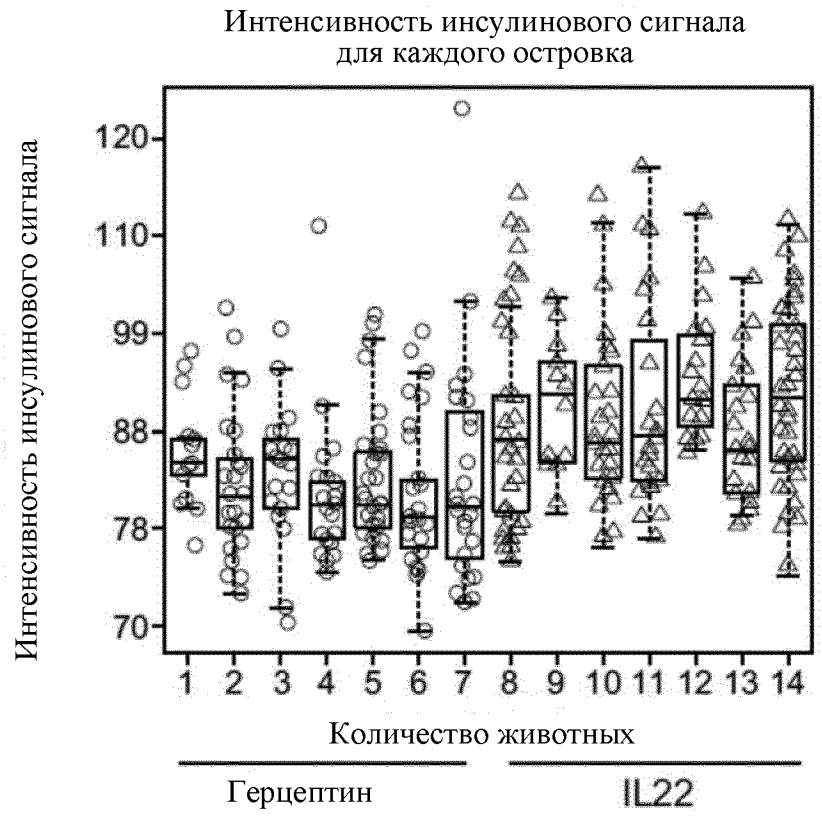
Фиг. 23D



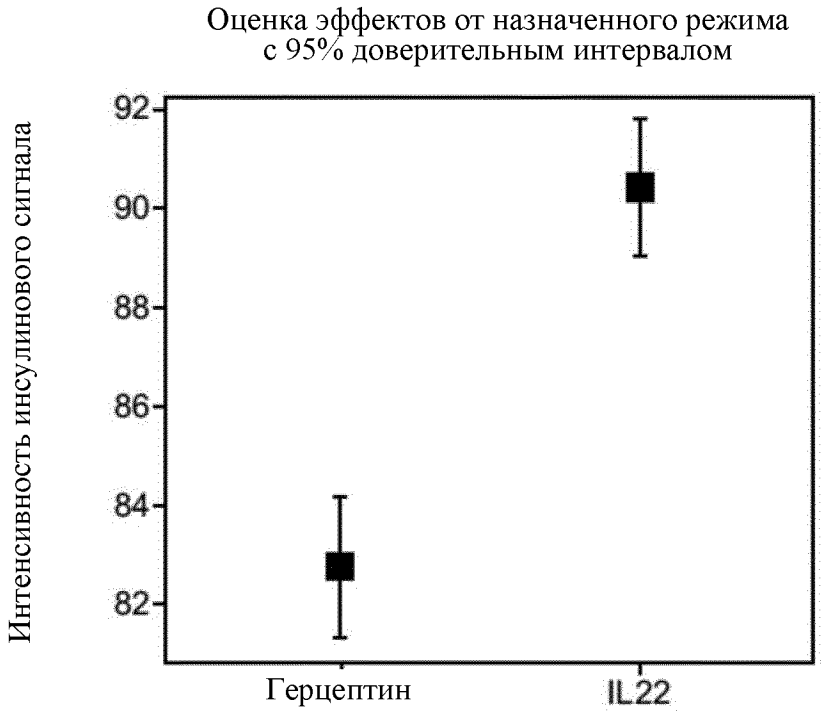
Фиг. 23E



Фиг. 23F

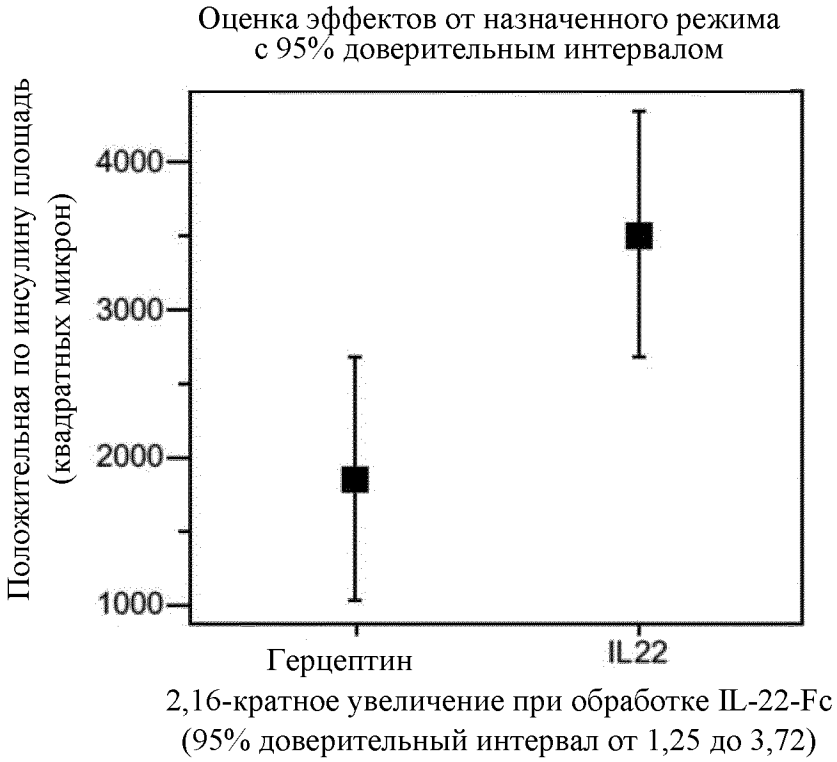


Фиг. 24A



Фиг. 24B

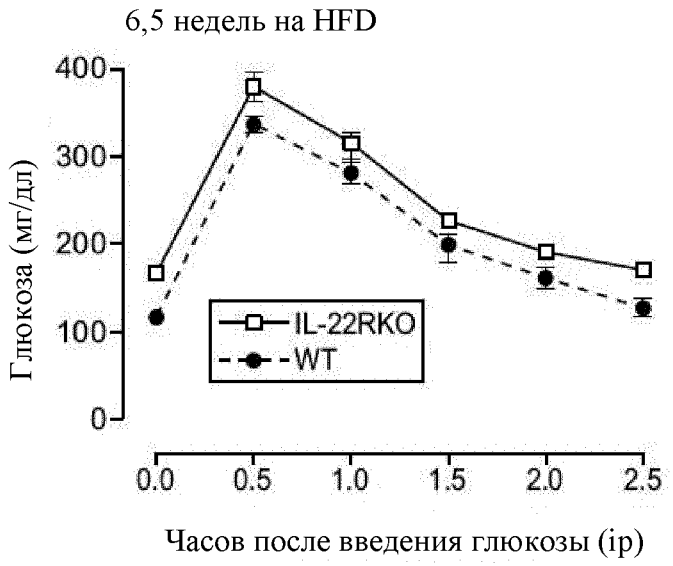
Фиг. 25A



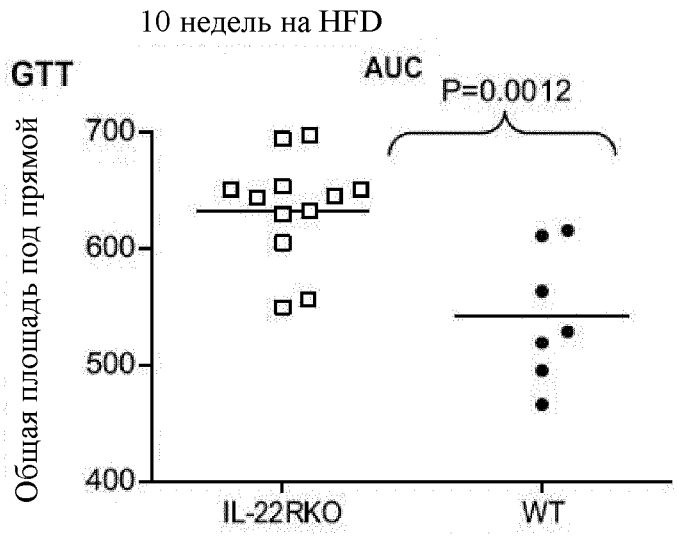
Фиг. 25B

Фиг. 26A

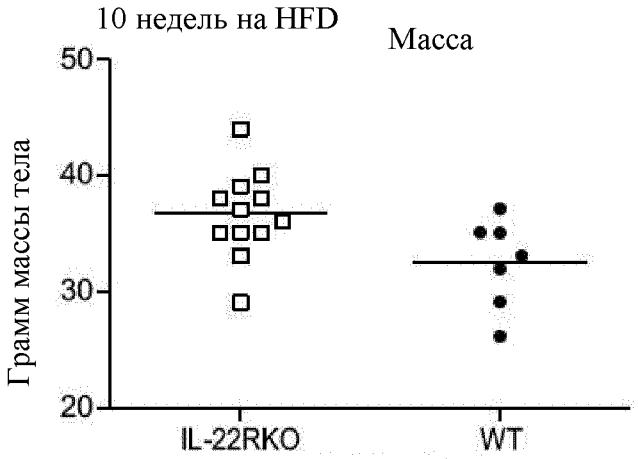
Фиг. 26B



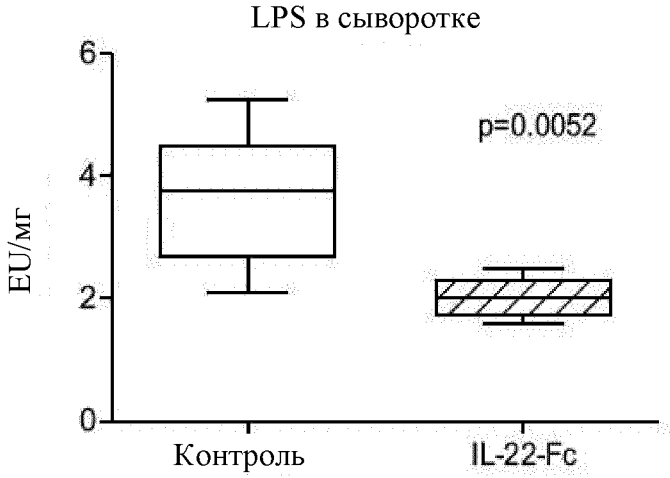
Фиг. 27A



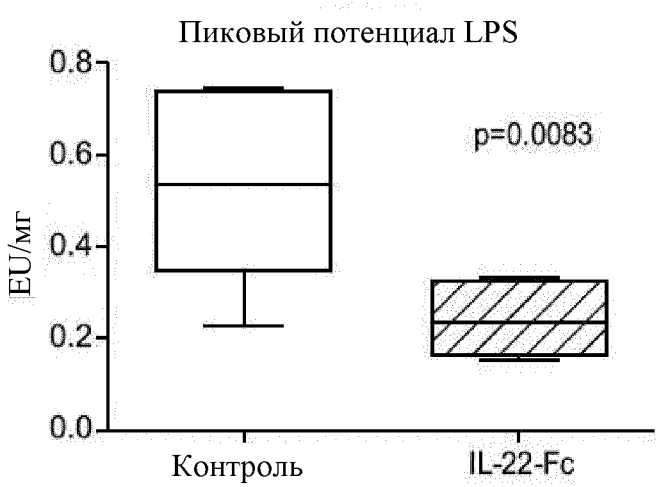
Фиг. 27B



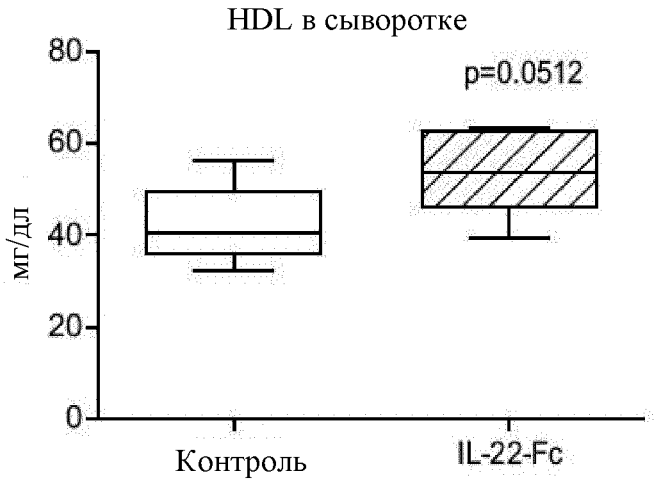
Фиг. 28



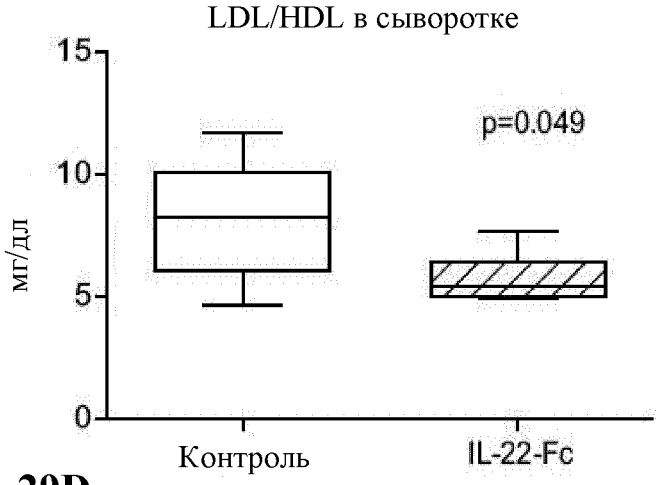
Фиг. 29A



Фиг. 29B



Фиг. 29C



Фиг. 29D

CTTCAGAACAGGTTCTCCTTCCCCAGTCACCAGTTGCTCGAGTTAGAATTGTCTGCA**ATG**GCCGCCC
TGCAGAAATCTGTGAGCTCTTTCCTTATGGGGACCCTGGCCACCAGCTGCCTCCTTCTCTTGGCCCT
CTTGGTACAGGGAGGAGCAGCTGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGCTTGACAAGTCCAACTTCCAG
CAGCCCTATATCACCAACCGCACCTTCATGCTGGCTAAGGAGGCTAGCTTGGCTGATAACAACACAG
ACGTTCGTCTCATTGGGGAGAAACTGTTCCACGGAGTCAGTATGAGTGAGCGCTGCTATCTGATGA
AGCAGGTGCTGAACTTCACCCTTGAAGAAGTGCTGTTCCCTCAATCTGATAGGTTCCAGCCTTATAT
GCAGGAGGTGGTGCCCTTCCTGGCCAGGCTCAGCAACAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGA
TGACCTGCATATCCAGAGGAATGTGCAAAAGCTGAAGGACACAGTGAAAAAGCTTGGAGAGAGTGG
AGAGATCAAAGCAATTGGAGAACTGGATTTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCCTGCATT**TGA**CC
AGAGCAAAGCTGAAAAATGAATAACTAACCCCCTTTCCCTGCTAGAAATAACAATTAGATGCCCCA
AAGCGATTTTTTTTAACCAAAAGGAAGATGGGAAGCCAAACTCCATCATGATGGGTGGATTCCAAA
TGAACCCCTGCGTTAGTTACAAAGGAAACCAATGCCACTTTTGTTTATAAGACCAGAAGGTAGACT
TTCTAAGCATAGATATTTATTGATAACATTTCATTGTAACTGGTGTTCTATACACAGAAAACAATT
TATTTTTTAAATAATTGTCTTTTTCCATAAAAAAGATTACTTTCCATTCCTTTAGGGGAAAAAACC
CCTAAATAGCTTCATGTTTCCATAATCAGTACTTTATATTTATAAATGTATTTATTATTATTATAA
GACTGCATTTTATTTATATCATTTTATTAATATGGATTTATTTATAGAAACATCATTCGATATTGC
TACTTGAGTGTAAGGCTAATATTGATATTTATGACAATAATTATAGAGCTATAACATGTTTATTTG
ACCTCAATAAACACTTGGATATCCC

SEQ ID NO. 70

Фиг. 30

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPVITNRTFMLAKEASLADN
NTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIE
GDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

SEQIDNO.71

Сигнальный пептид: аминокислоты 1-33

Фиг. 31

mIL22mIgG2a

Белок

MAVLQKSMSFSLMGTLAASCLLLIALWAQEANALPVNTRCKLEVSNFQQPYIVNRTFMLA
KEASLADNNTDVRLIGEKLFRGVSAKDQCYLMKQVLNFTLEDVLLPQSDRFQPYMQEVVP
FLTKLSNQLSSCHISGDDQNIQKNVRRLKETVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACVAR
GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN
NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK
GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMYTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD
SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSYVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ. ID. NO. 73

Фиг. 32A

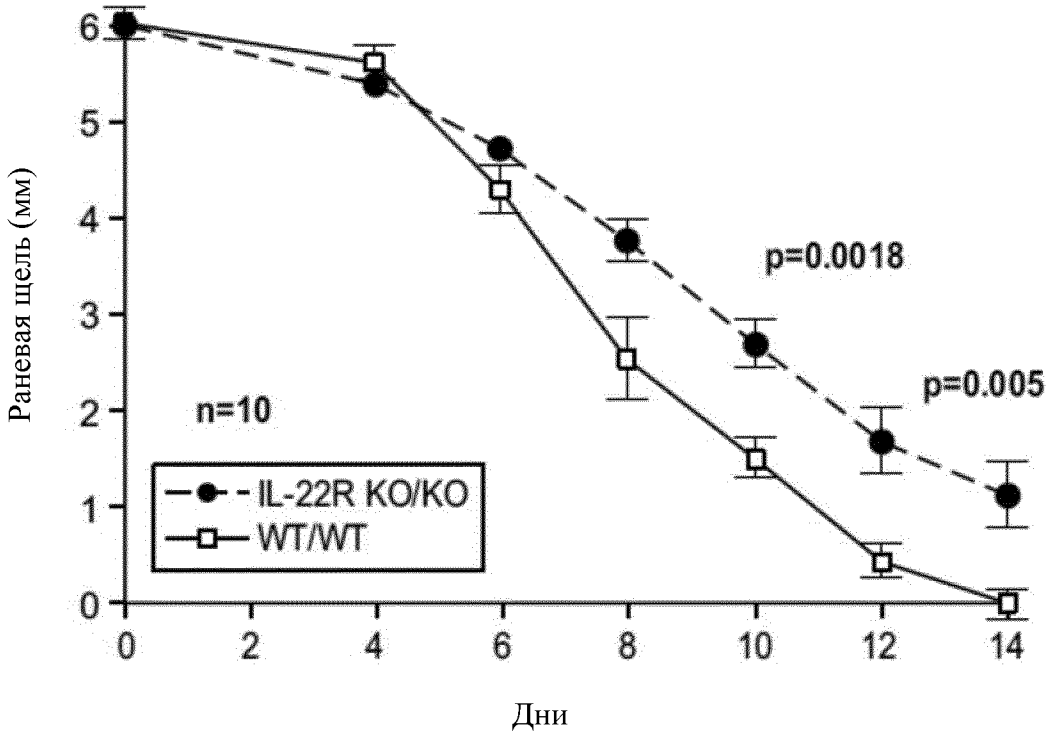
mIL22mIgG2a

Последовательность ДНК:

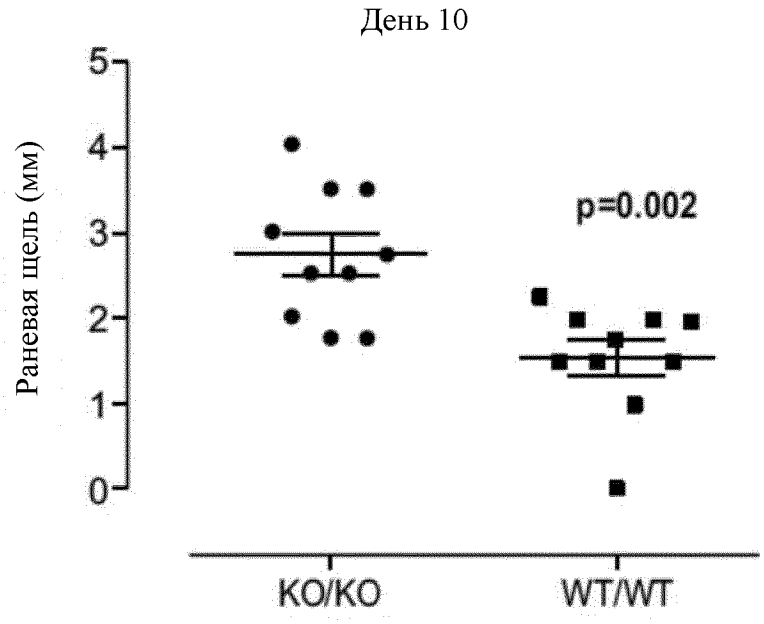
ATGGCTGTCCTGCAGAAATCTATGAGTTTTTCCCTTATGGGGACTTTGGCCGCCAGCTG
CCTGCTTCTCATTGCCCTGTGGGCCCAGGAGGCAAATGCGC
TGCCCGTCAACACCCGGTGCAAGCTTGAGGTGTCCAACTTCCAGCAGCCATACATCGT
CAACCGCACCTTTATGCTGGCCAAGGAGGCCAGCCTTGCAGA
TAACAACACAGATGTCCGGCTCATCGGGGAGAAACTGTTCCGAGGAGTCAGTGCTAAG
GATCAGTGCTACCTGATGAAGCAGGTGCTCAACTTCACCCTG
GAAGACGTTCTGCTCCCCCAGTCAGACAGGTTCCAGCCCTACATGCAGGAGGTGGTGC
CTTTCCTGACCAAACTCAGCAATCAGCTCAGCTCCTGTCACA
TCAGCGGTGACGACCAGAACATCCAGAAGAATGTCAGAAGGCTGAAGGAGACAGTGA
AAAAGCTTGGAGAGAGTGGAGAGATCAAGGCGATTGGGGAACT
GGACCTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCTTGCGTCGCTCGAGGACCCACAATCAAG
CCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGT
GGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAG
CCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATG
ACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGAC
ACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTACGCGTGGT
CAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAG
GTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATC
TCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAG
AAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCA
CAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGC
TAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTC
TTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAG
CTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCAC
ACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGA

SEQ. ID. NO. 72

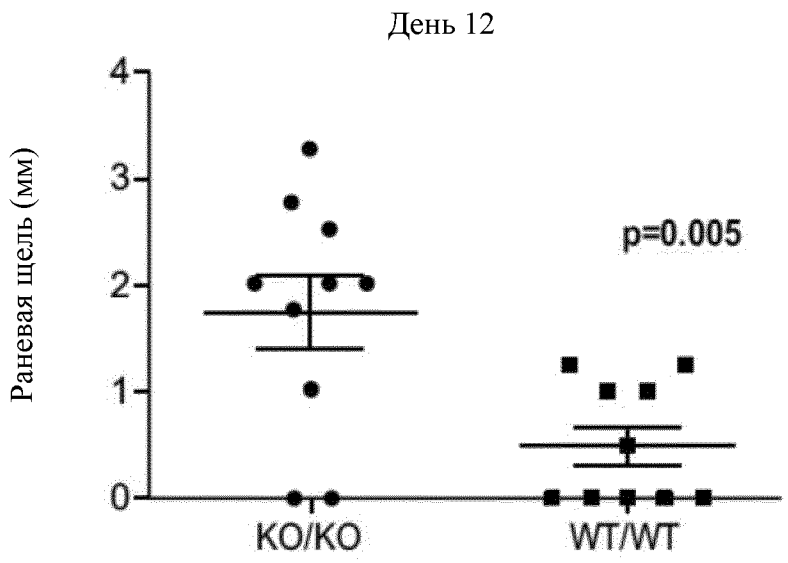
Фиг. 32B



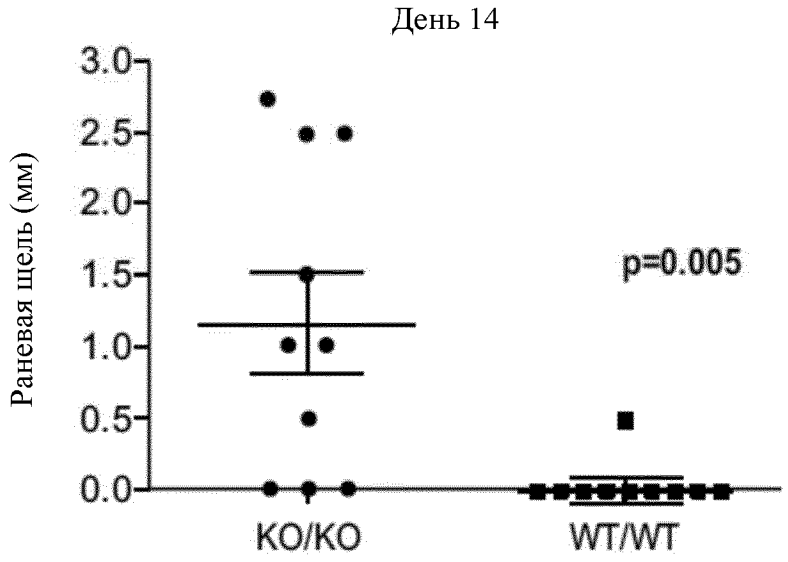
Фиг. 33



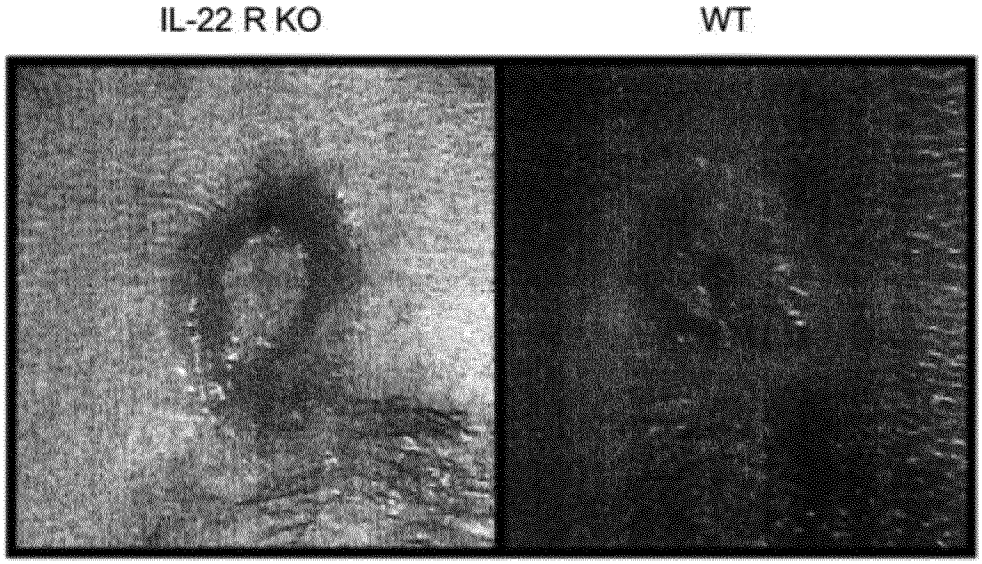
Фиг. 34A



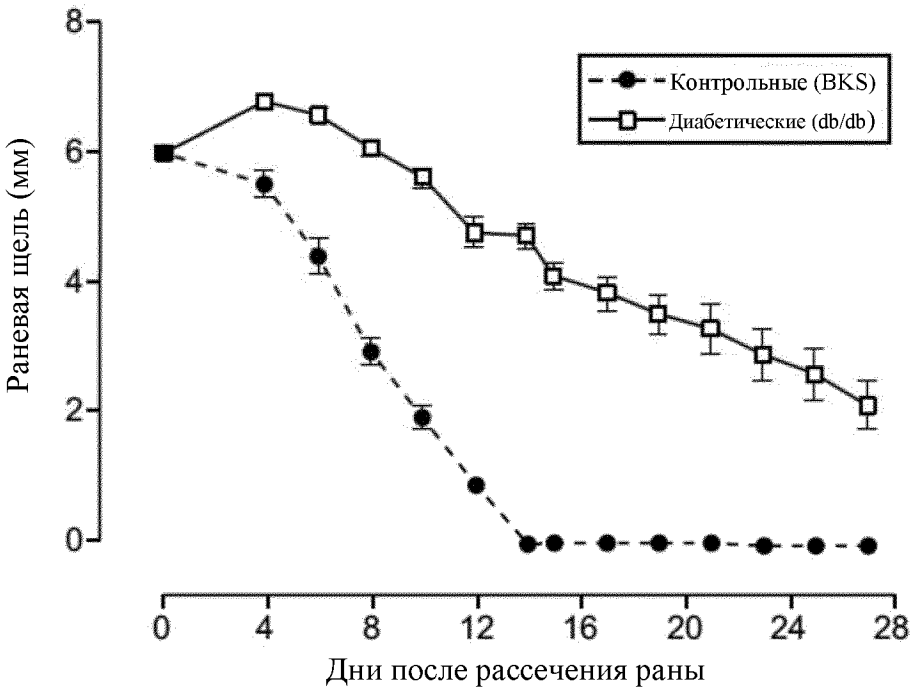
Фиг. 34B



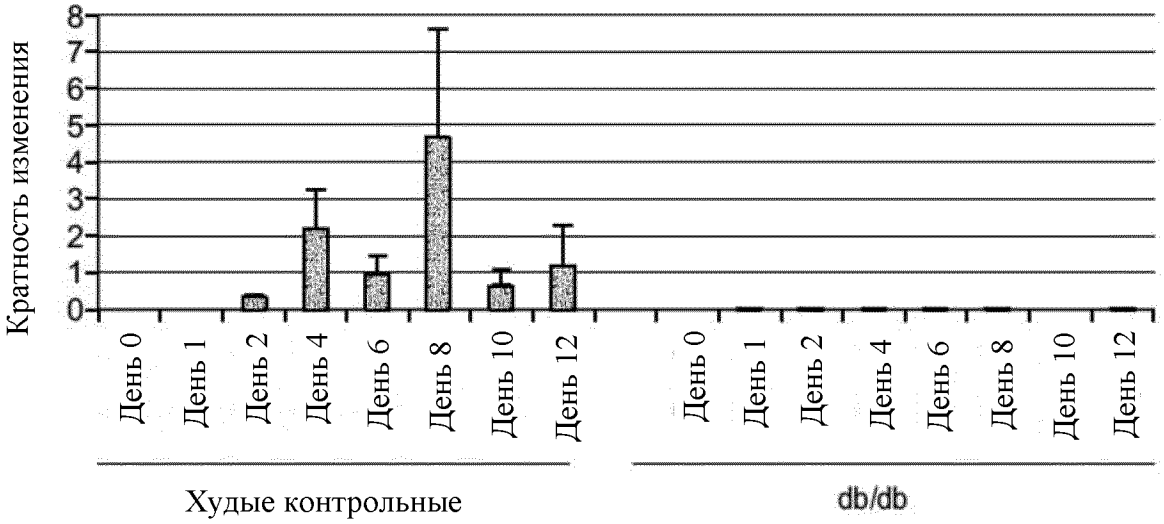
Фиг. 34C



Фиг. 34D

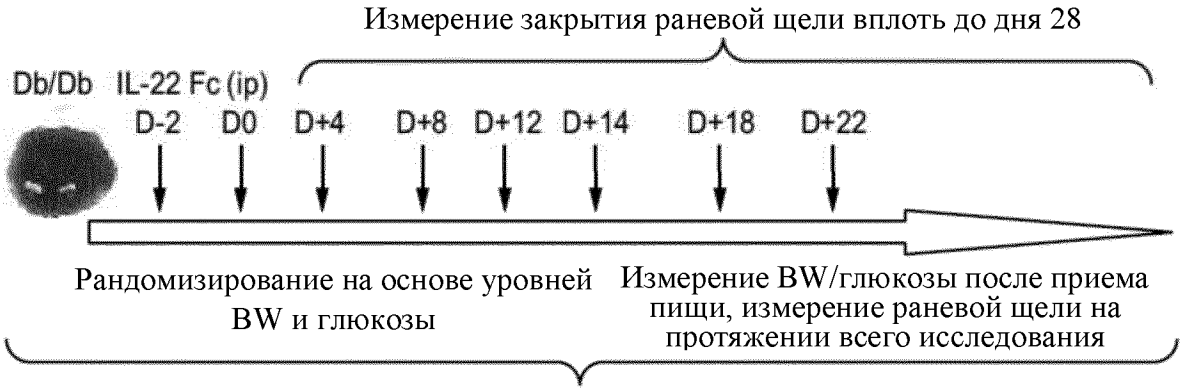


Фиг. 35A

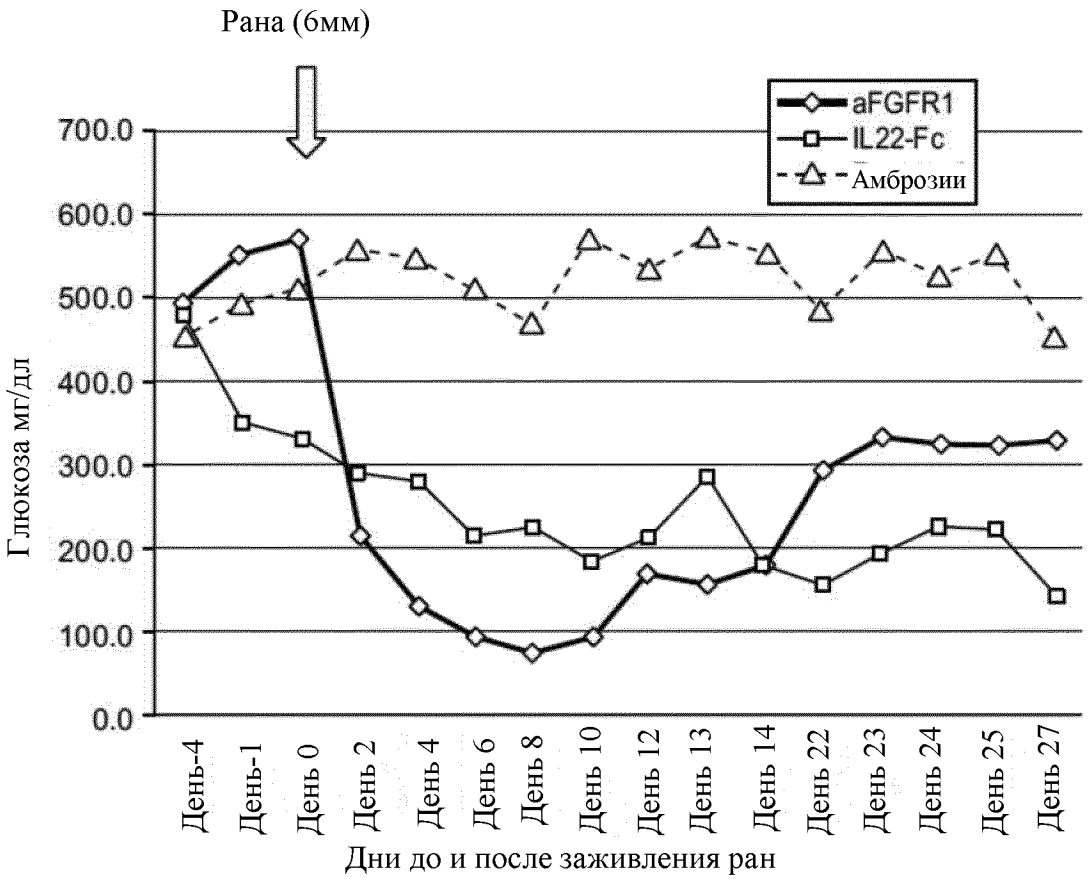


Фиг. 35B

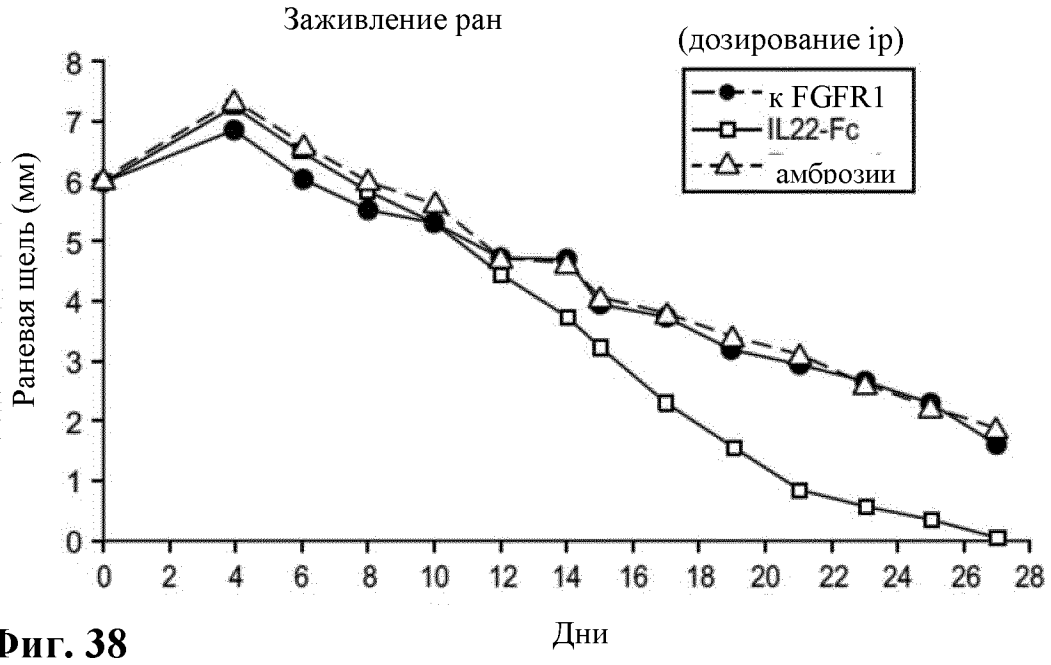
Схема эксперимента



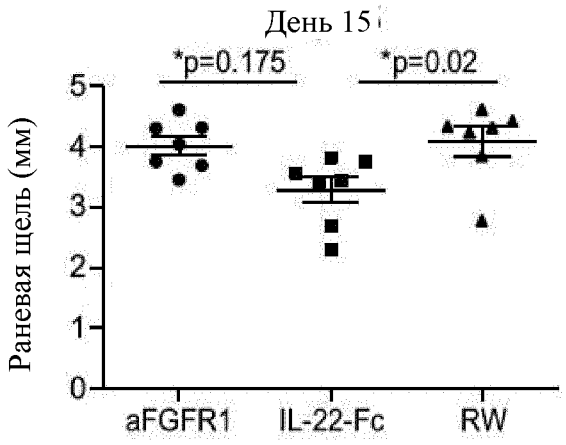
Фиг. 36


Рана (6мм)
aFGFR1
IL22-Fc
Амброзии
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
Глюкоза мг/дл
День-4
День-1
День 0
День 2
День 4
День 6
День 8
День 10
День 12
День 13
День 14
День 22
День 23
День 24
День 25
День 27
Дни до и после заживления ран

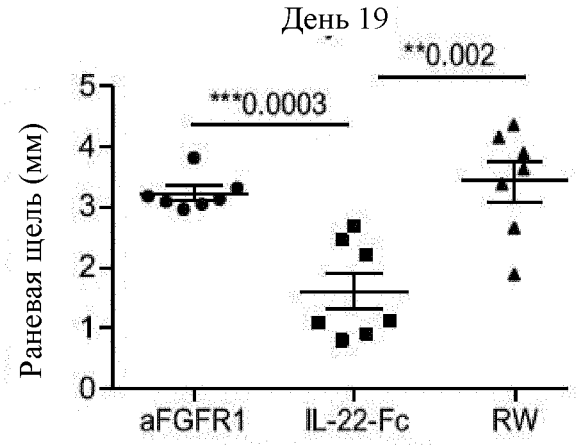
Фиг. 37


Заживление ран
(дозирование ip)
к FGFR1
IL22-Fc
амброзии
Раневая щель (мм)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
Дни

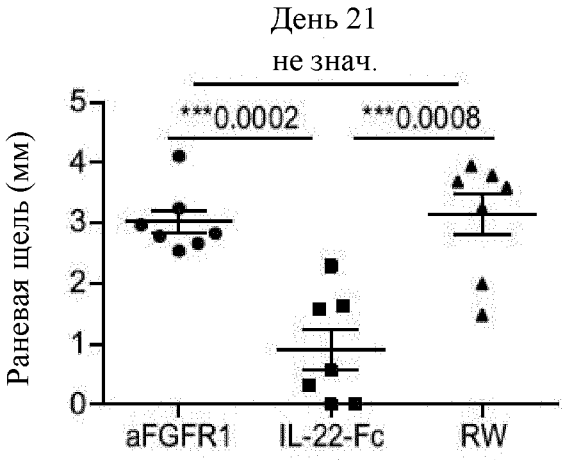
Фиг. 38



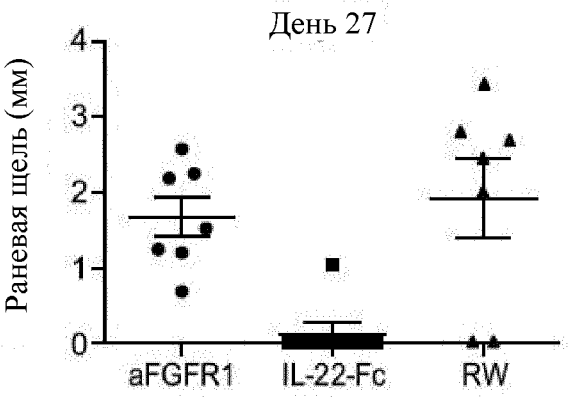
Фиг. 39A



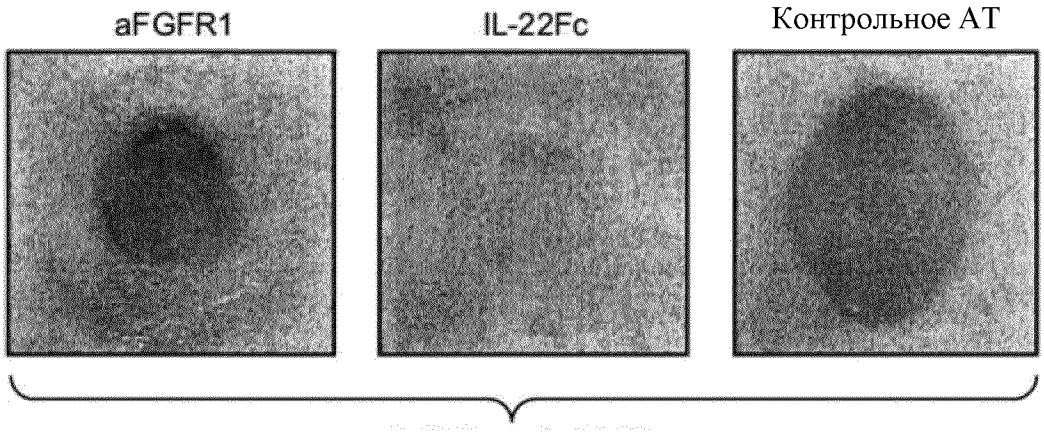
Фиг. 39B



Фиг. 39C

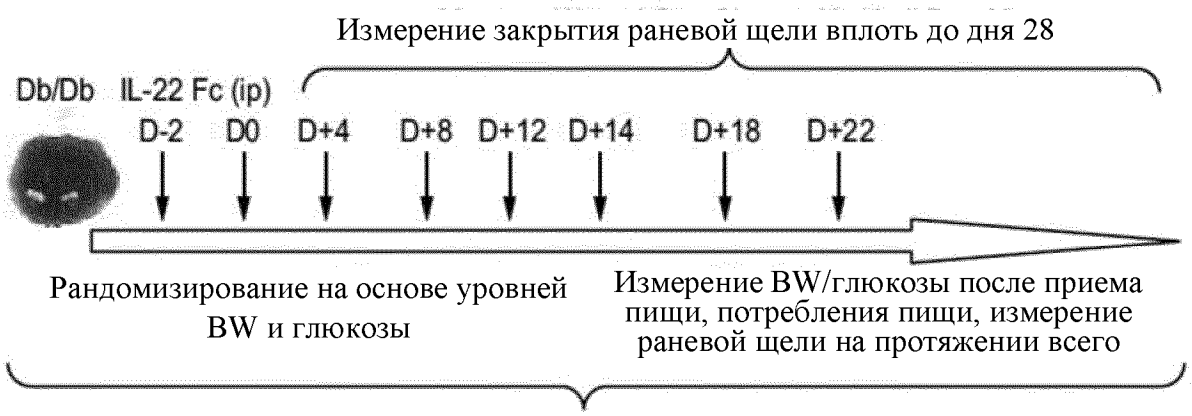


Фиг. 39D

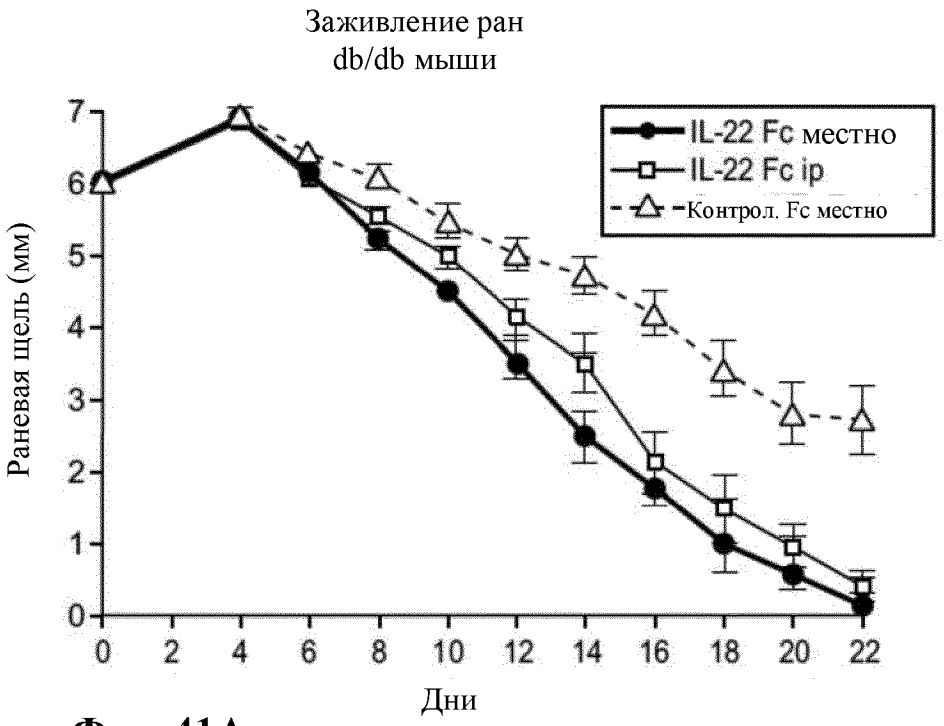


Фиг. 39E

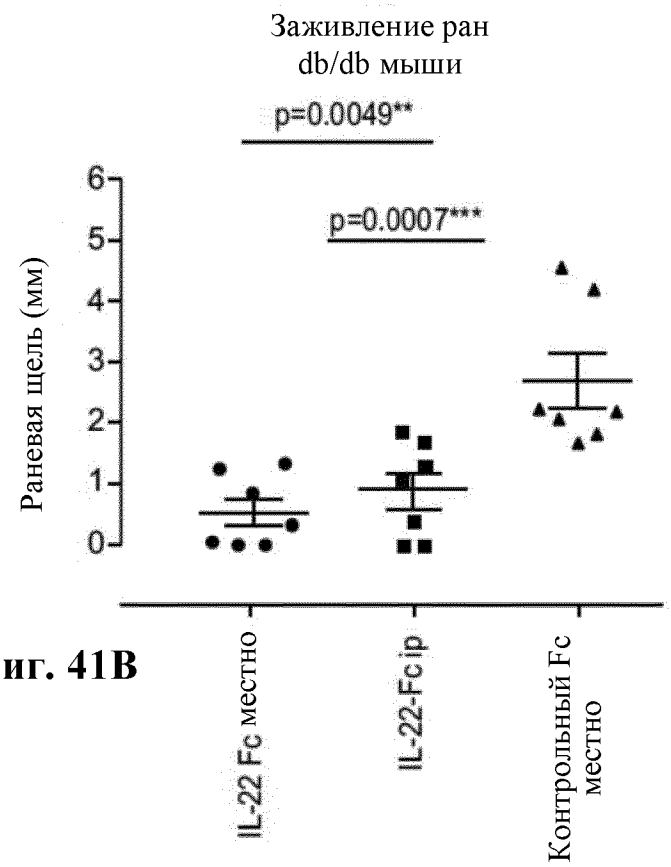
Схема эксперимента



Фиг. 40



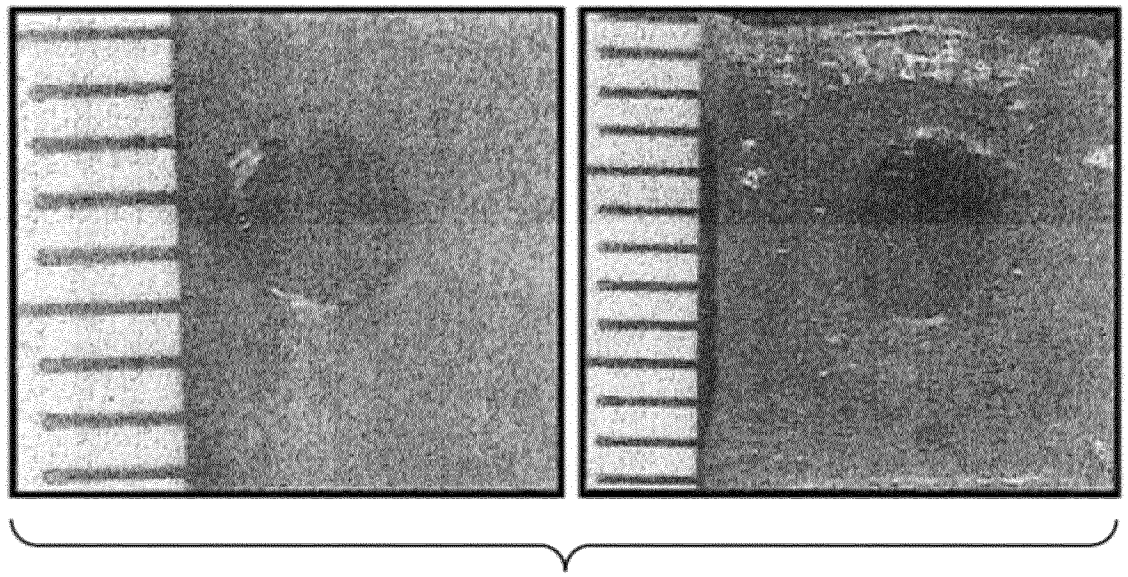
Фиг. 41A



Фиг. 41B

Контрольное антитело:

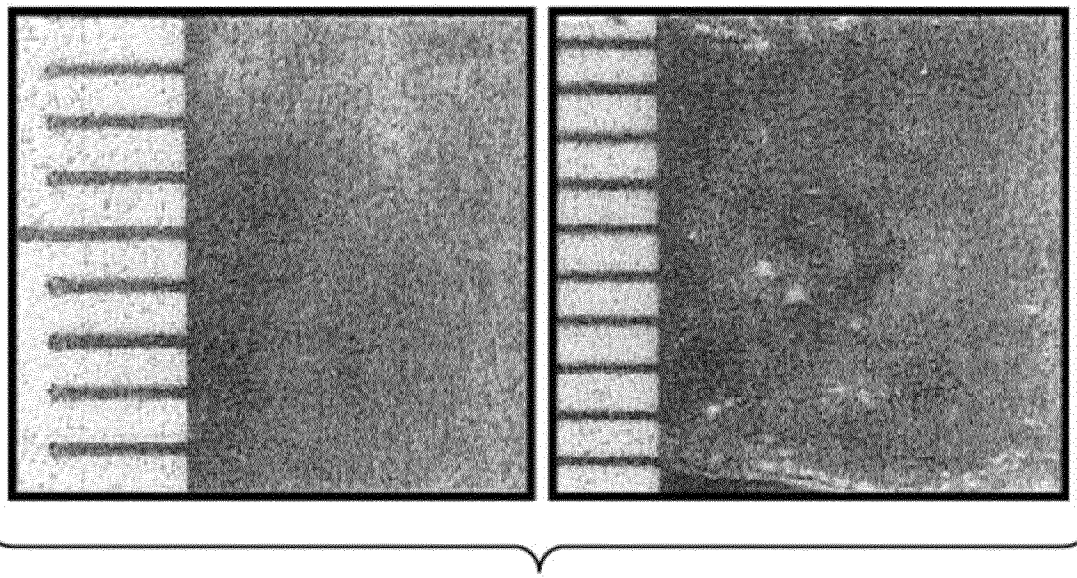
Вид сверху Вид сзади



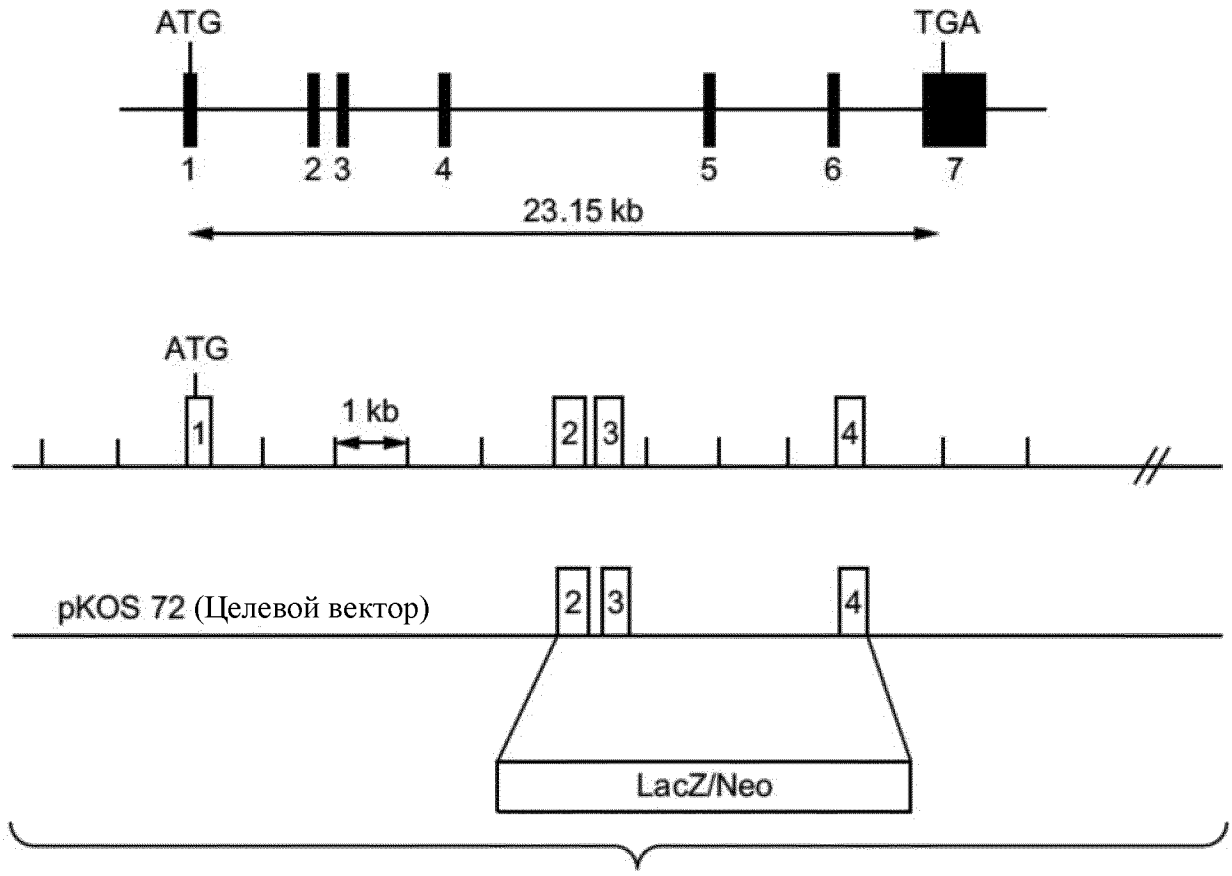
Фиг. 42A

IL-22Fc:

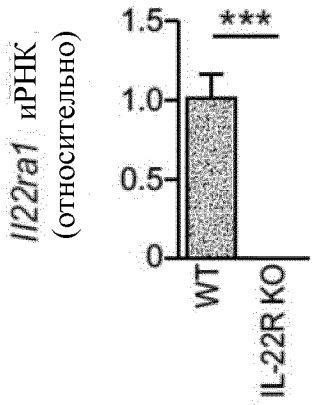
Вид сверху Вид сзади



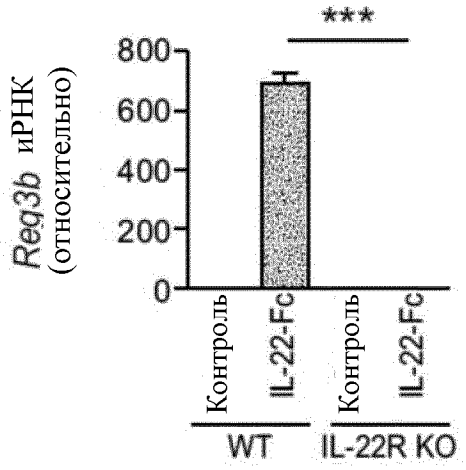
Фиг. 42B



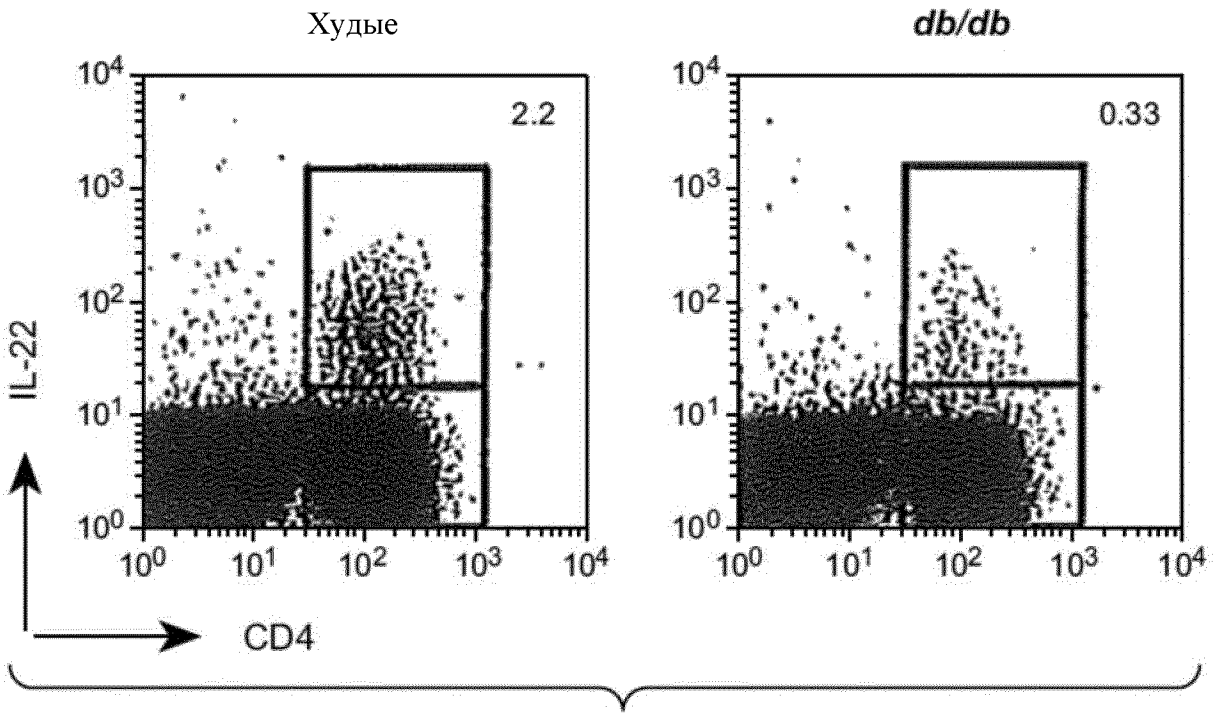
Фиг. 43A



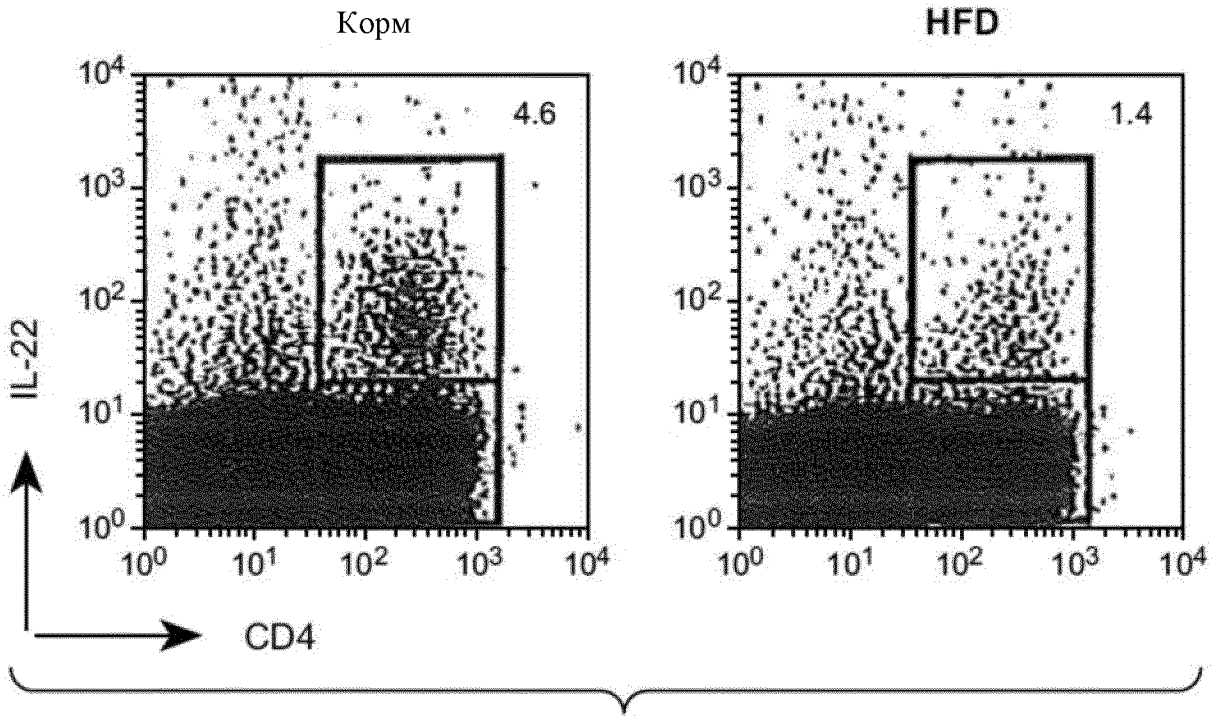
Фиг. 43B



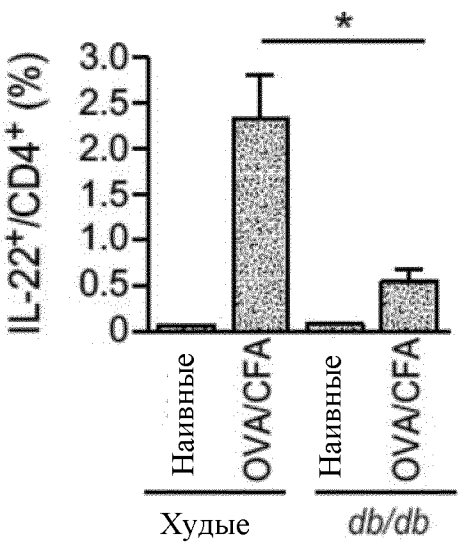
Фиг. 43C



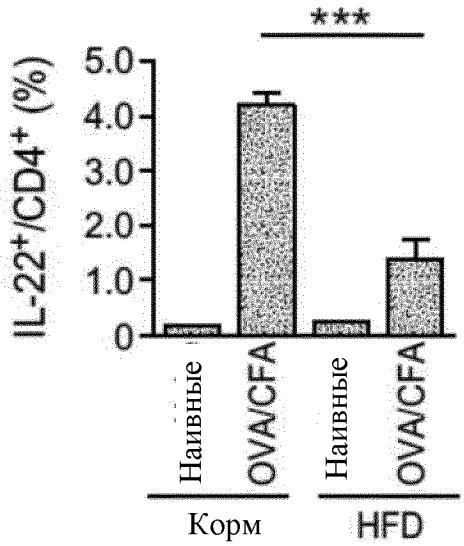
Фиг. 44A



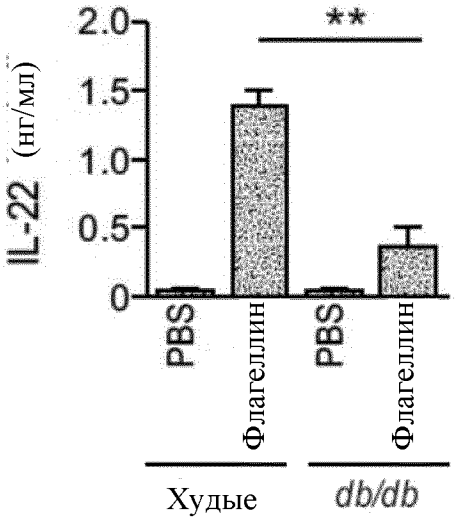
Фиг. 44C



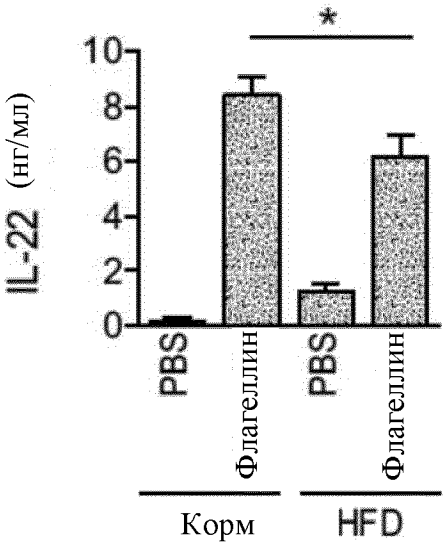
Фиг. 44B



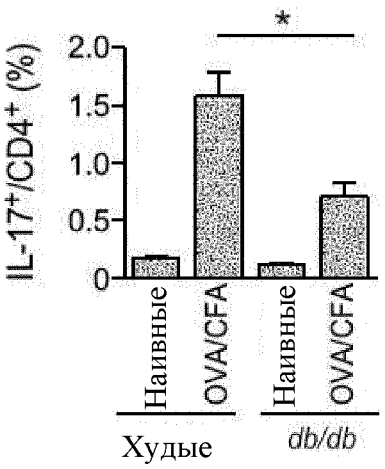
Фиг. 44D



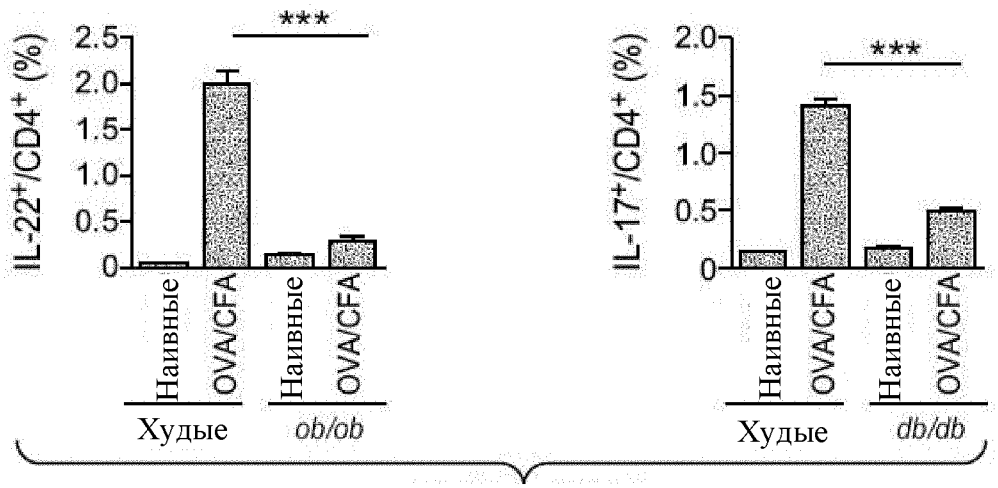
Фиг. 44E



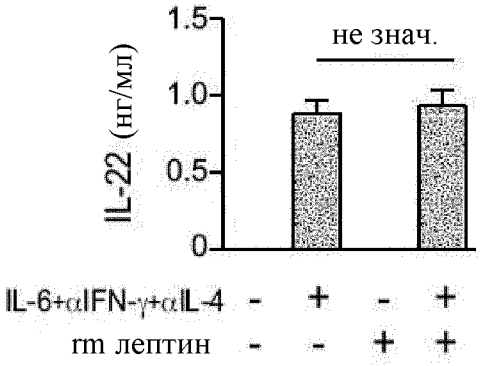
Фиг. 44F



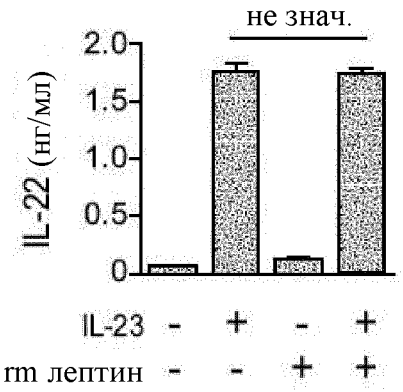
Фиг. 45A



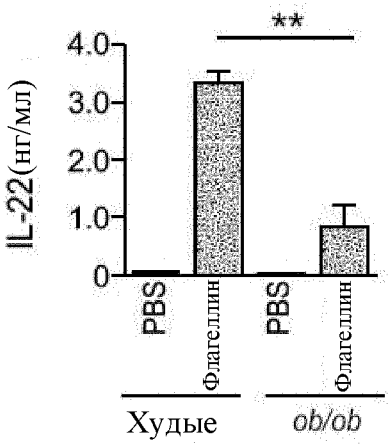
Фиг. 45B



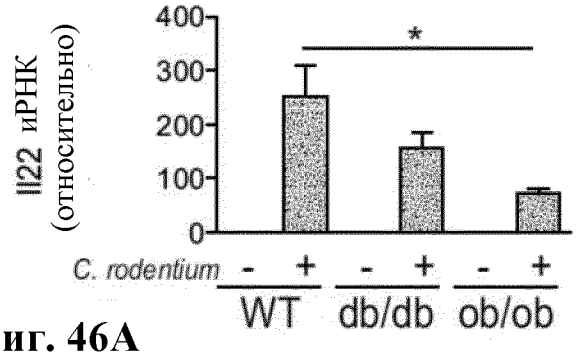
Фиг. 45C



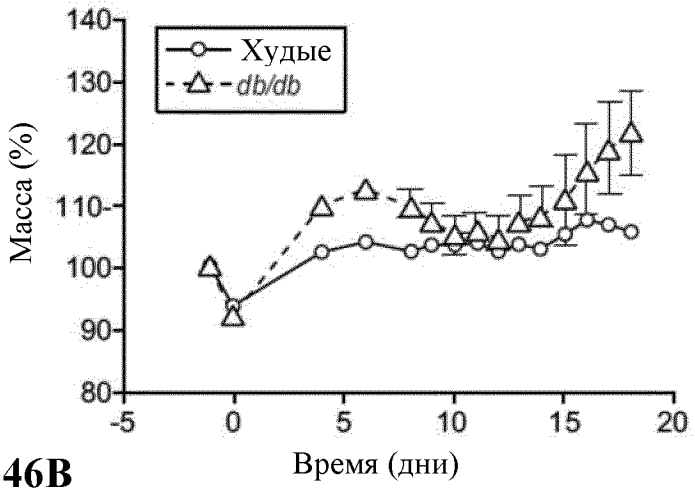
Фиг. 45D



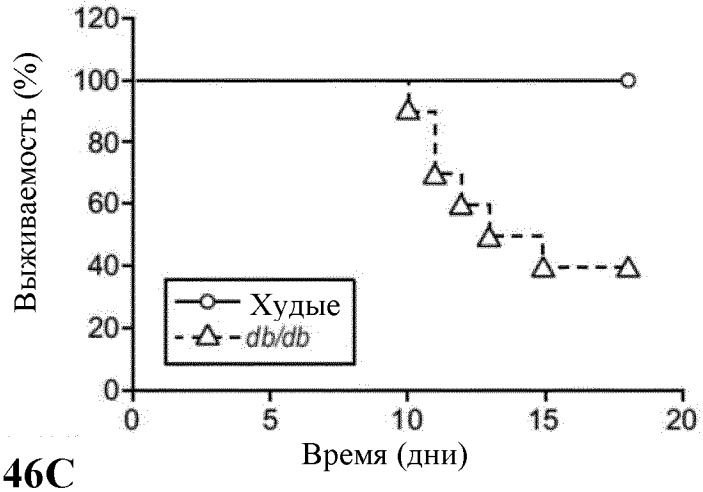
Фиг. 45E



Фиг. 46A

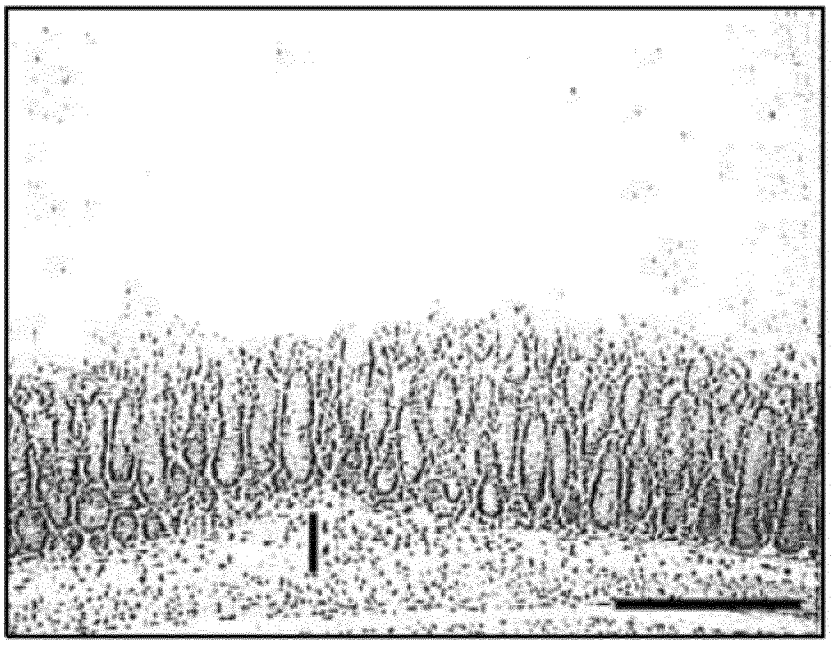


Фиг. 46B



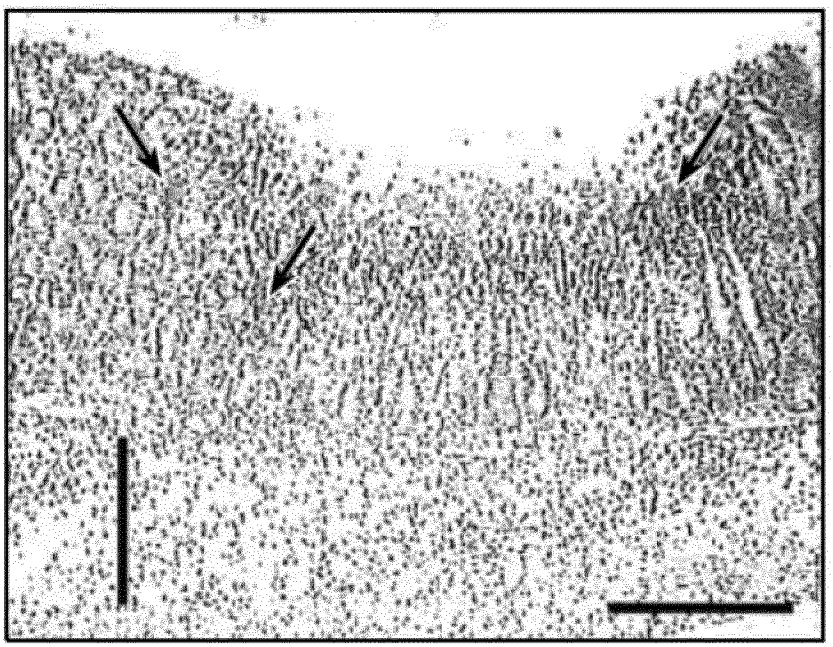
Фиг. 46C

Худые

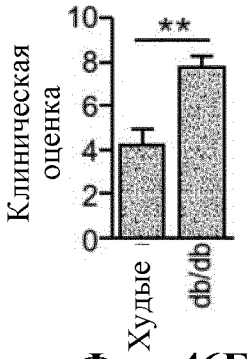


Фиг. 46D

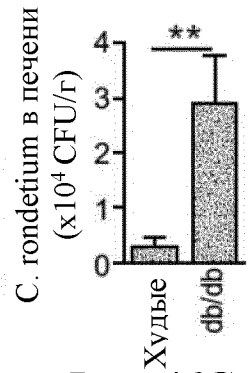
db/db



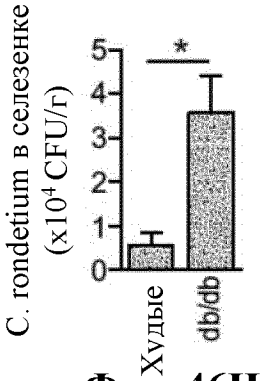
Фиг. 46E



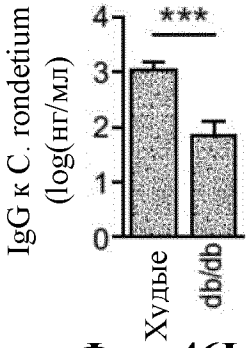
Фиг. 46F



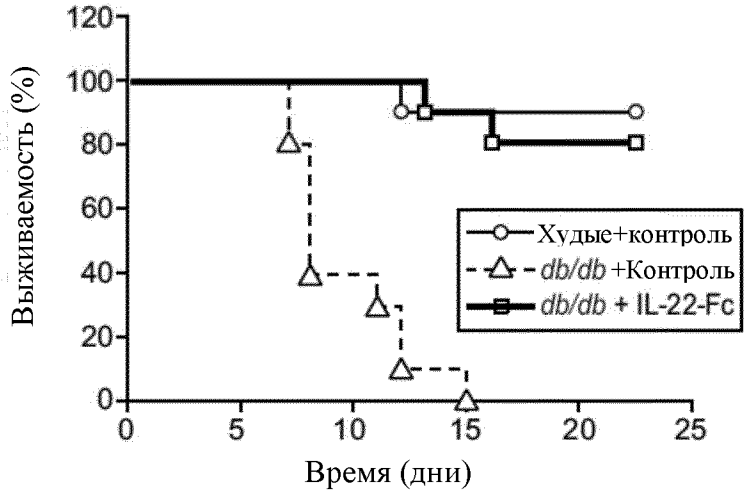
Фиг. 46G



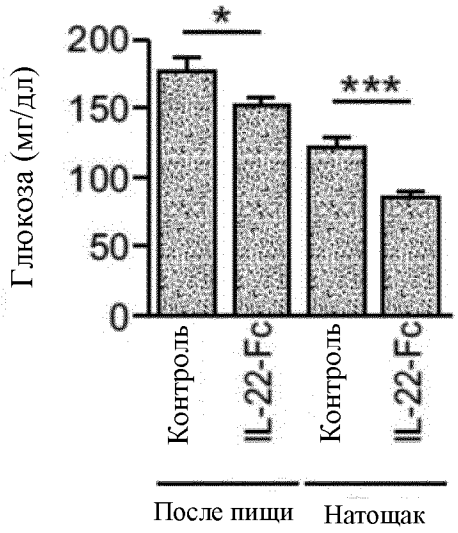
Фиг. 46H



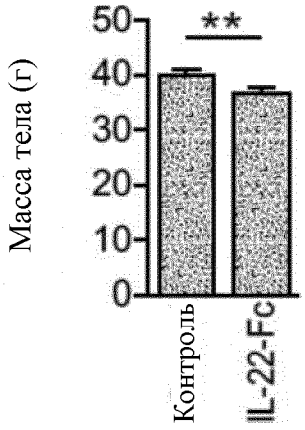
Фиг. 46I



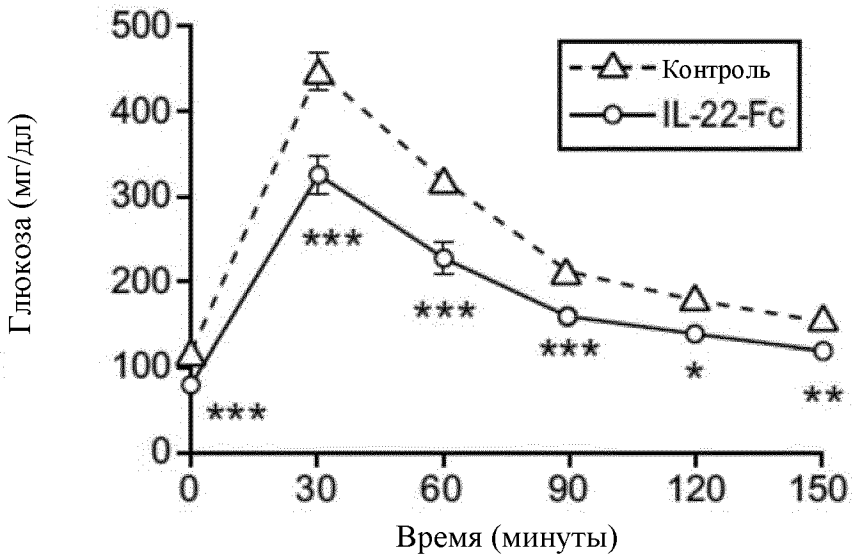
Фиг. 46J



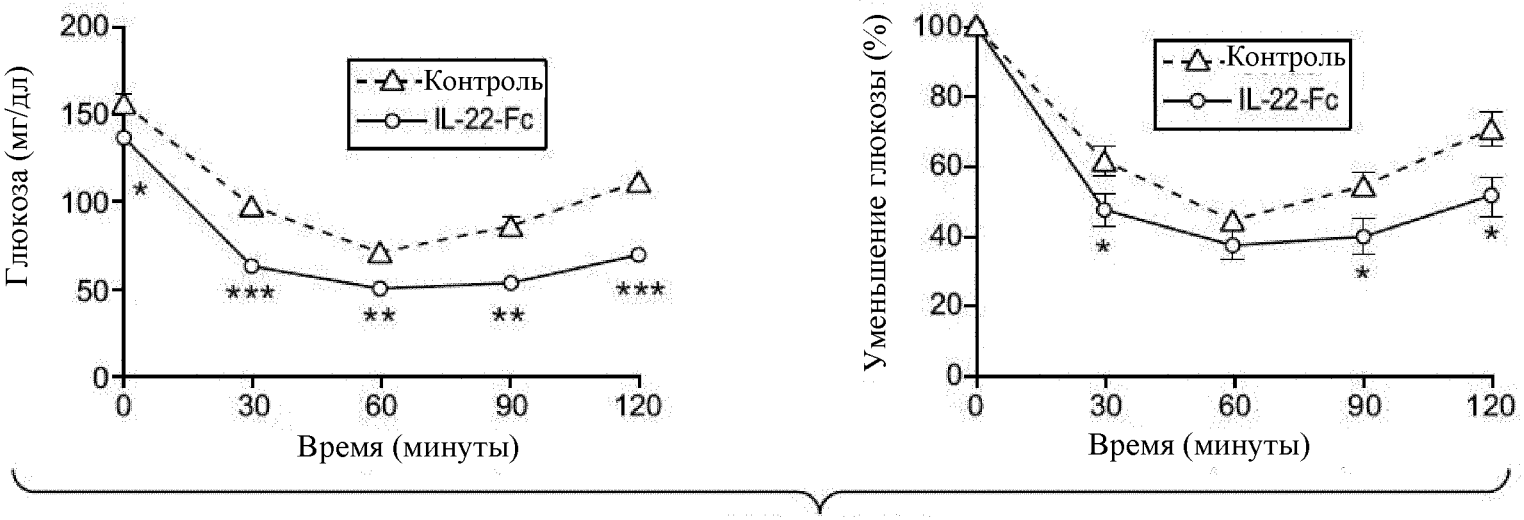
Фиг. 47А



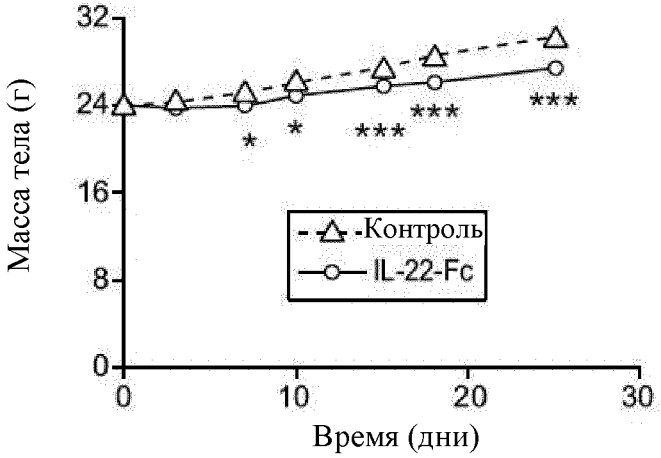
Фиг. 47В



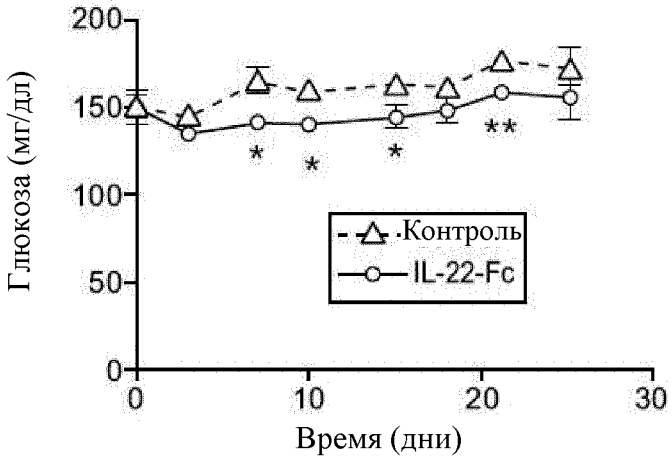
Фиг. 47В



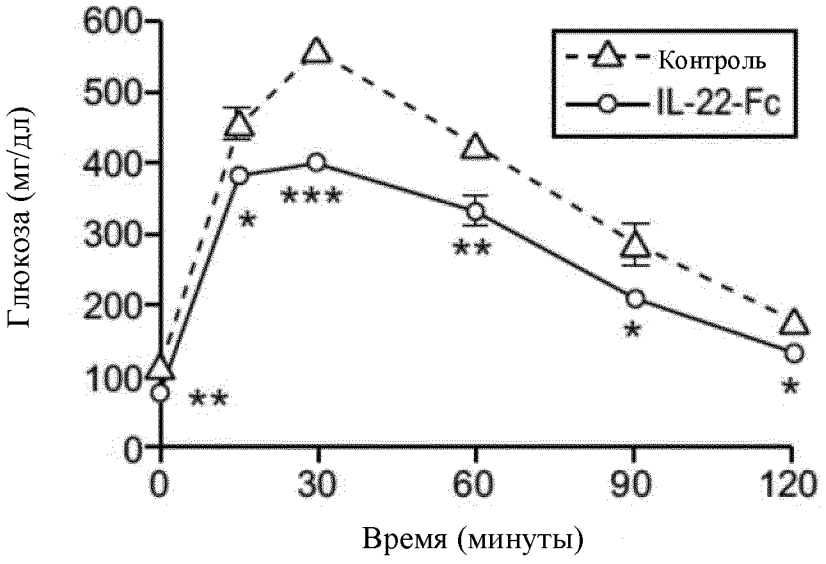
Фиг. 47D



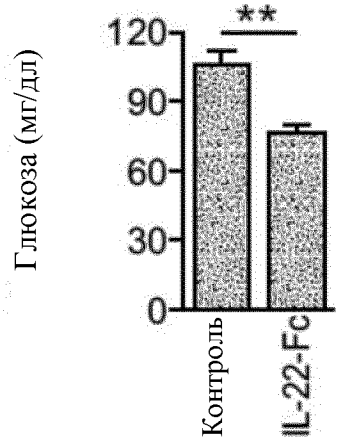
Фиг. 48A



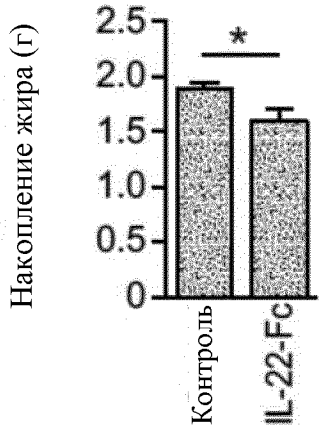
Фиг. 48B



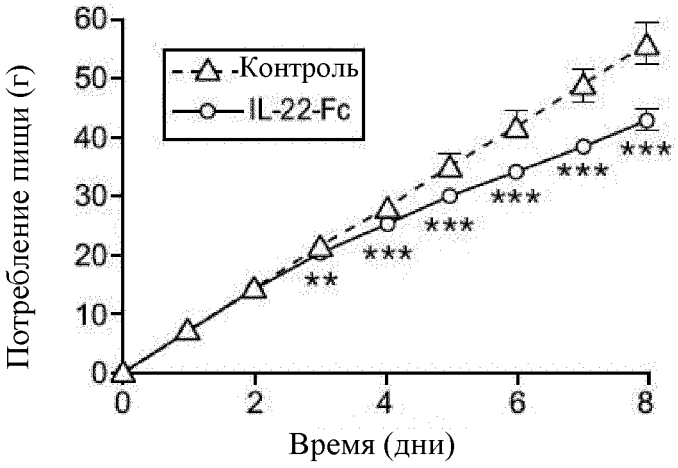
Фиг. 48C



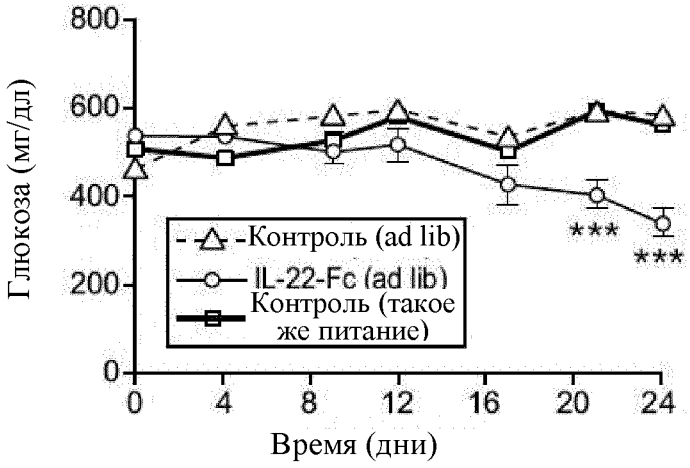
Фиг. 48D



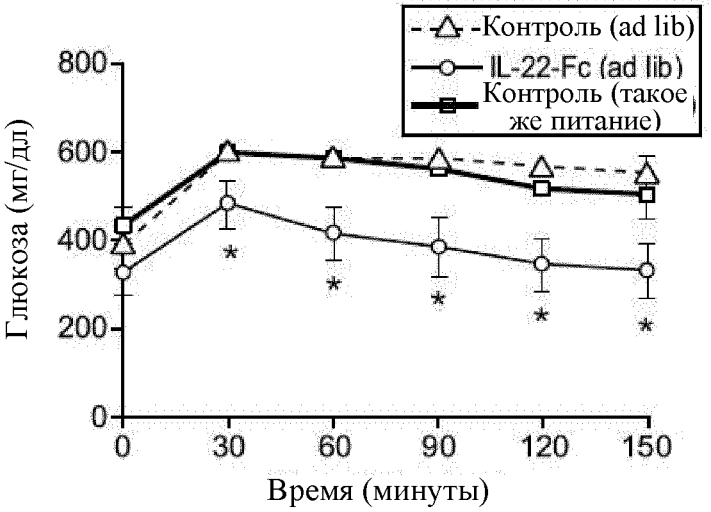
Фиг. 48E



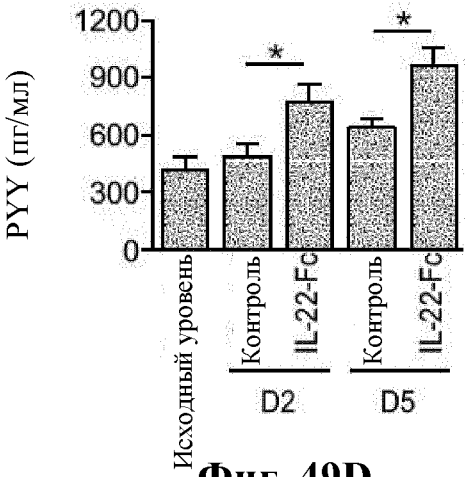
Фиг. 49A



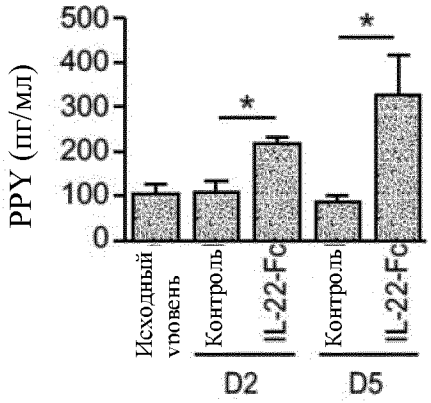
Фиг. 49B



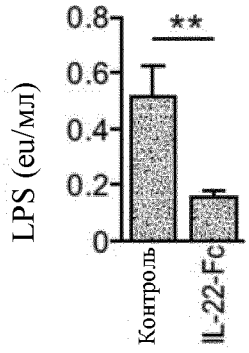
Фиг. 49C



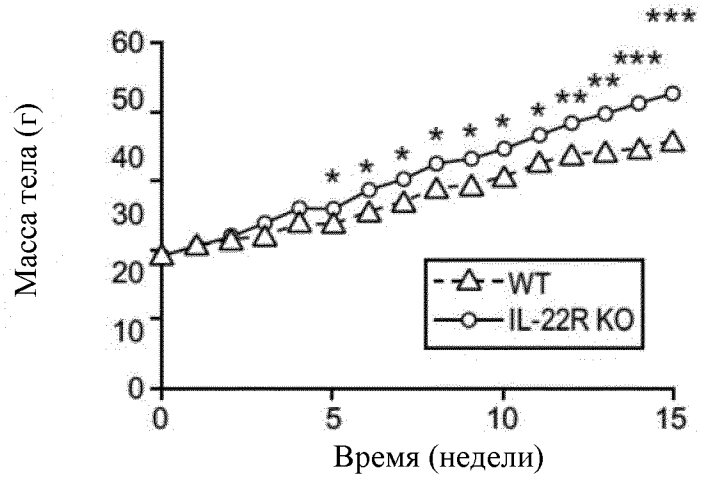
Фиг. 49D



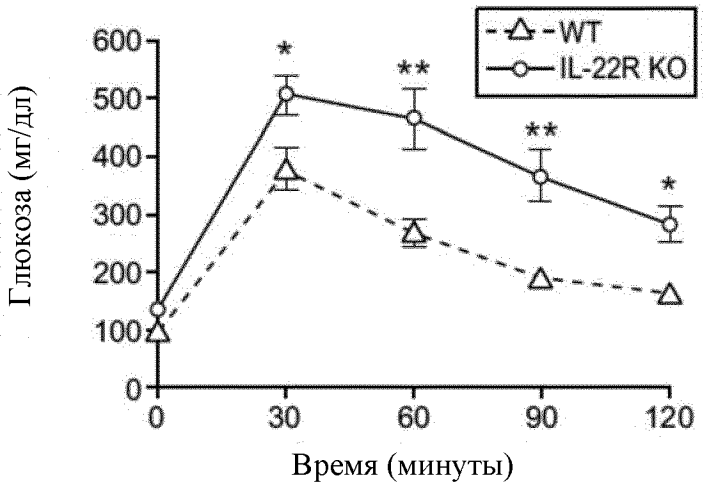
Фиг. 49E



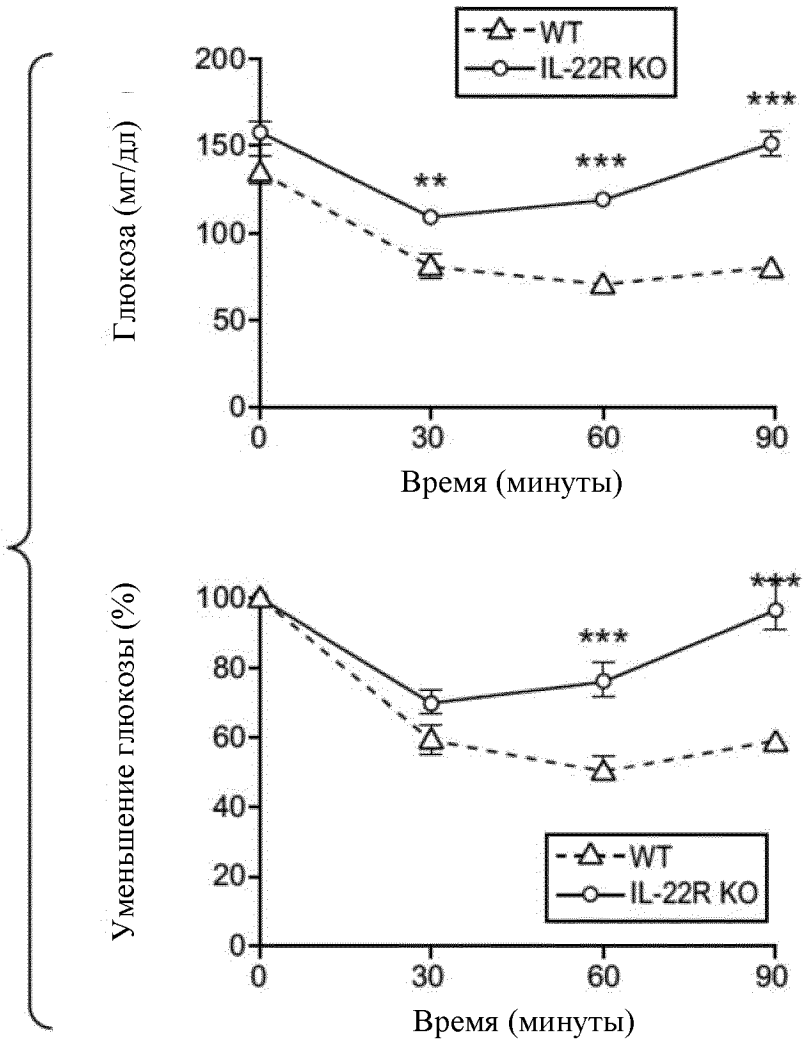
Фиг. 49F



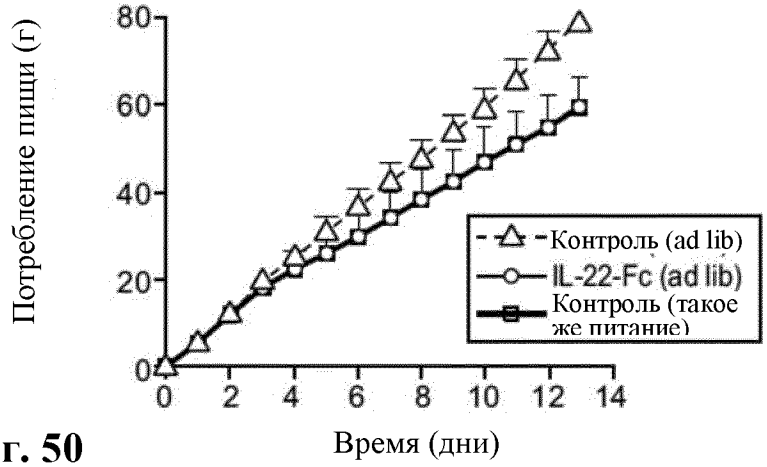
Фиг. 49G



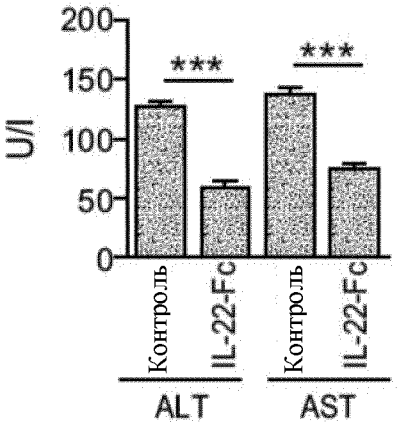
Фиг. 49H



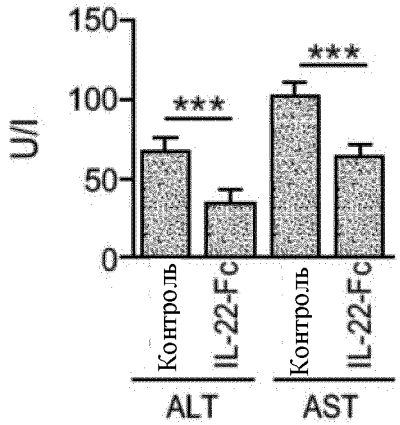
Фиг. 49I



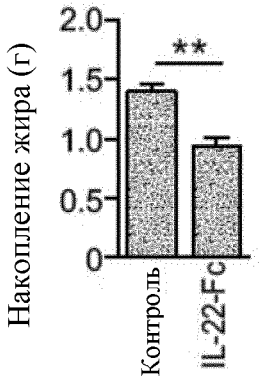
Фиг. 50



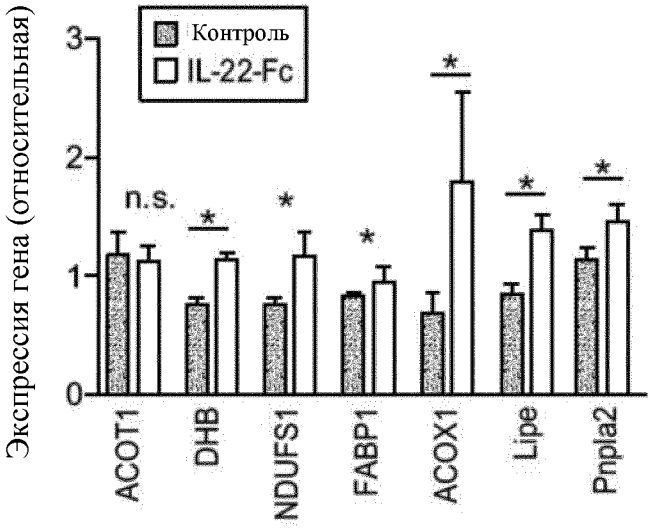
Фиг. 51A



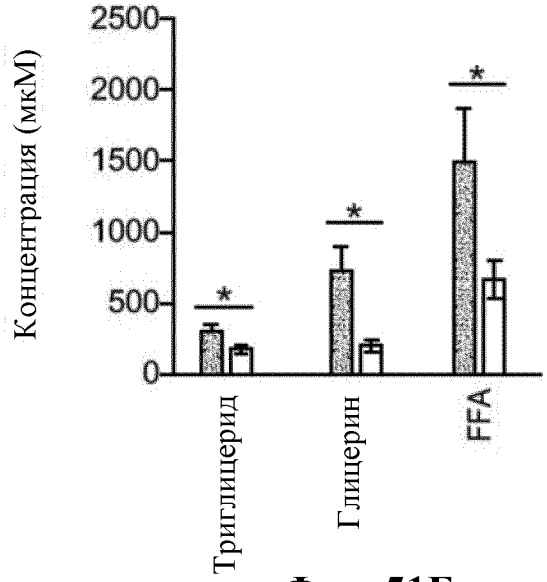
Фиг. 51B



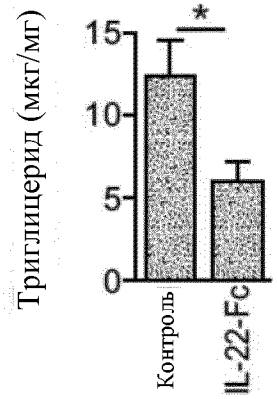
Фиг. 51C



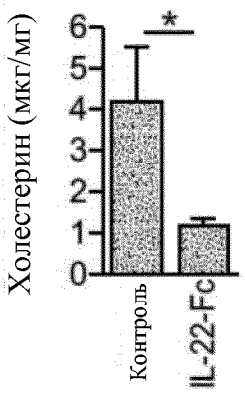
Фиг. 51D



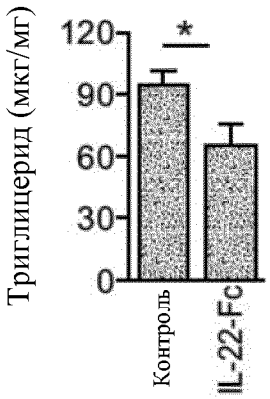
Фиг. 51E



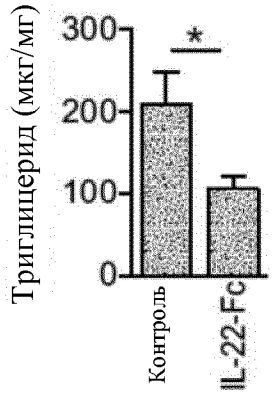
Фиг. 51F



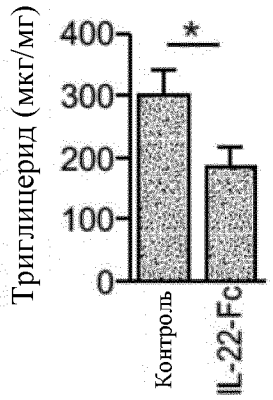
Фиг. 51G



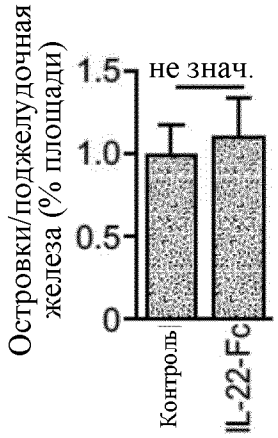
Фиг. 51H



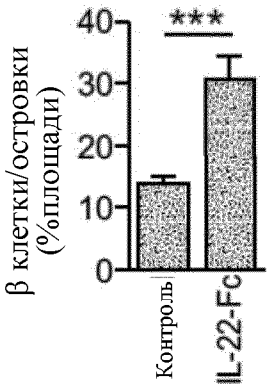
Фиг. 51I



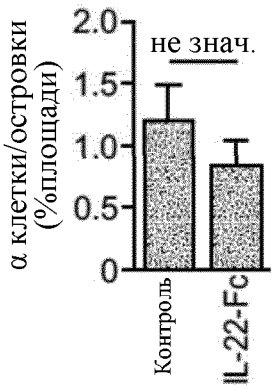
Фиг. 51J



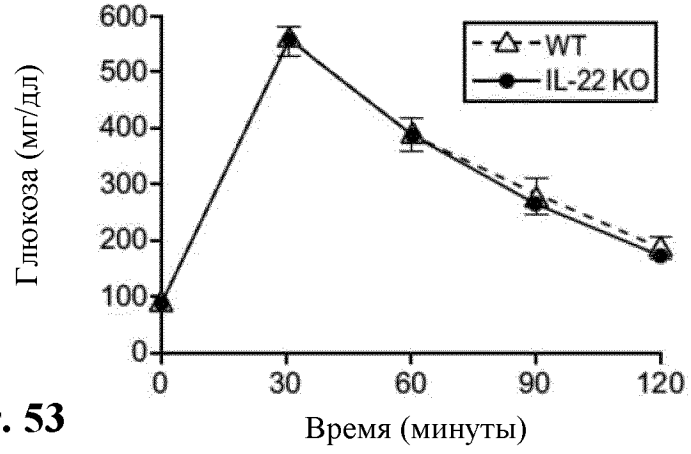
Фиг. 52A



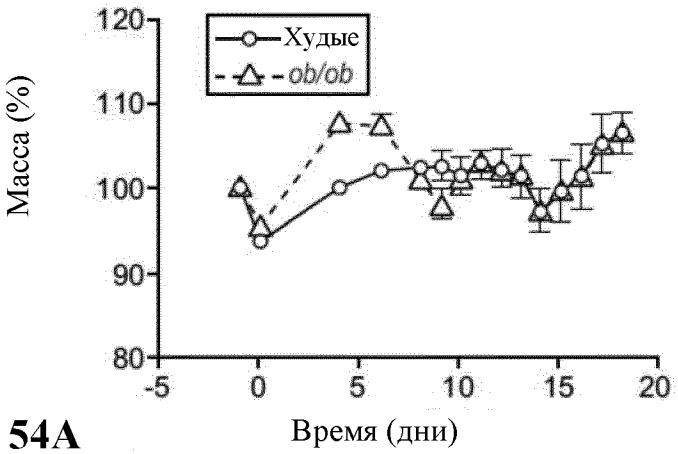
Фиг. 52B



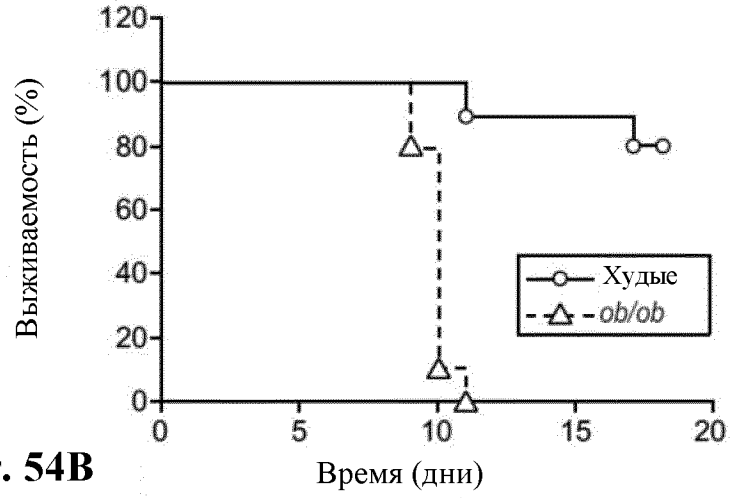
Фиг. 52C



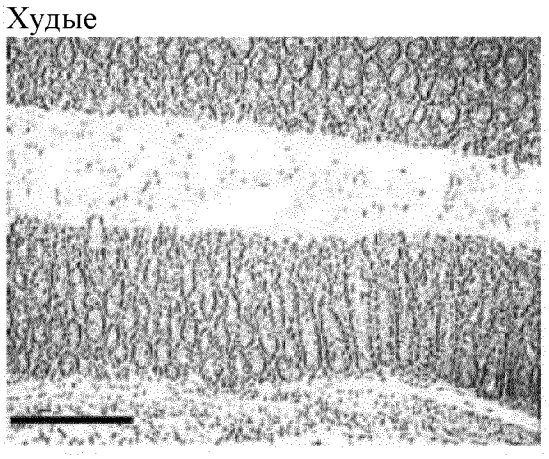
Фиг. 53



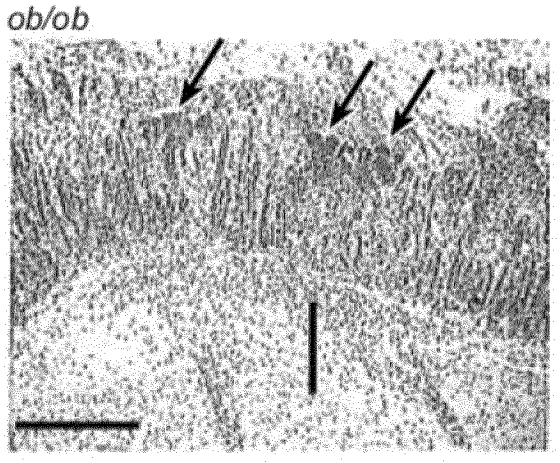
Фиг. 54A



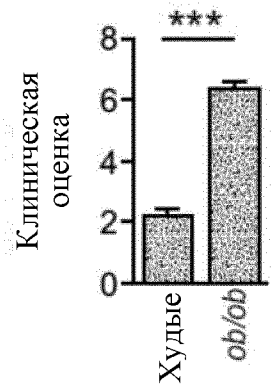
Фиг. 54B



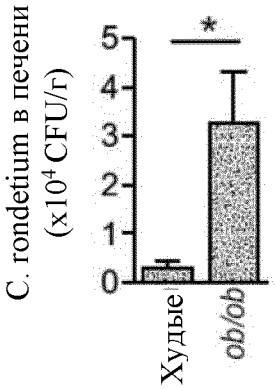
Фиг. 54C



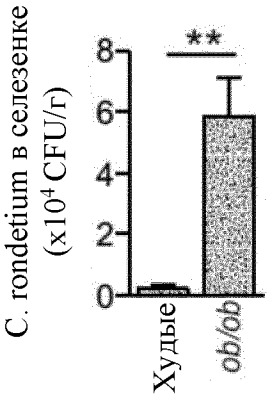
Фиг. 54D



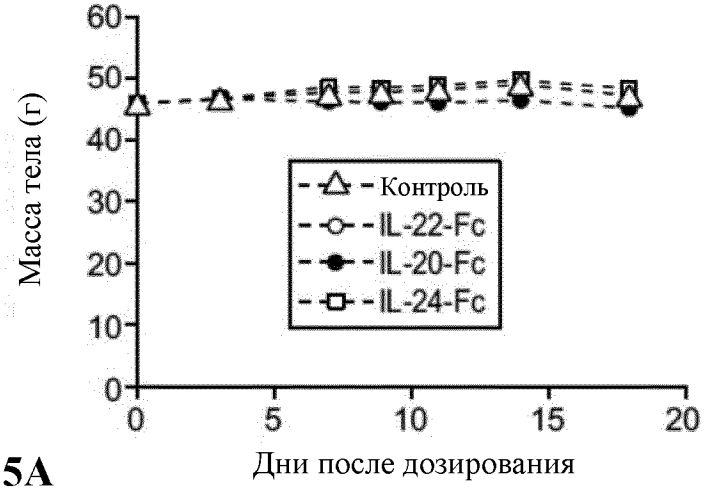
Фиг. 54E



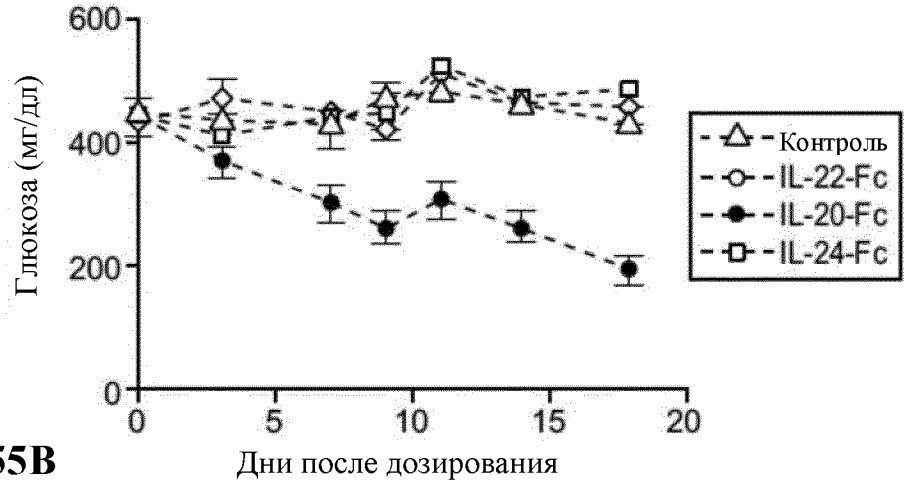
Фиг. 54F



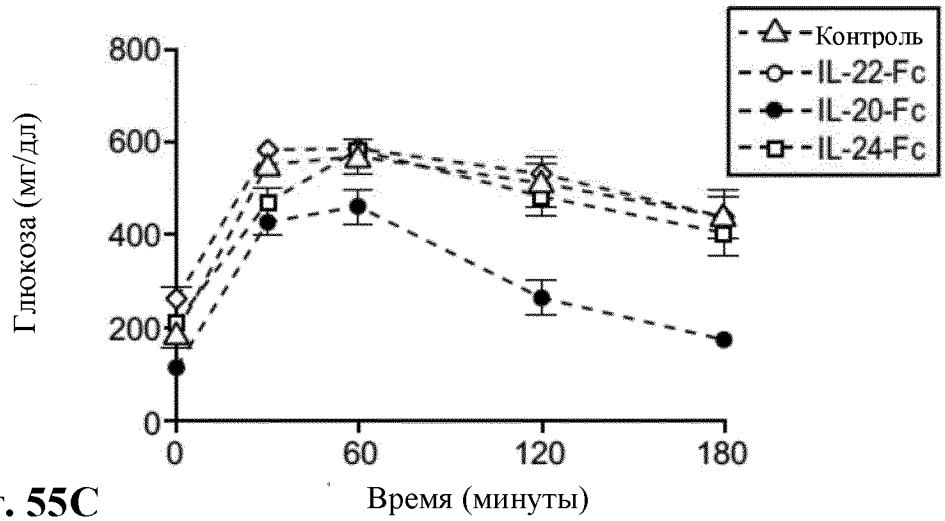
Фиг. 54G



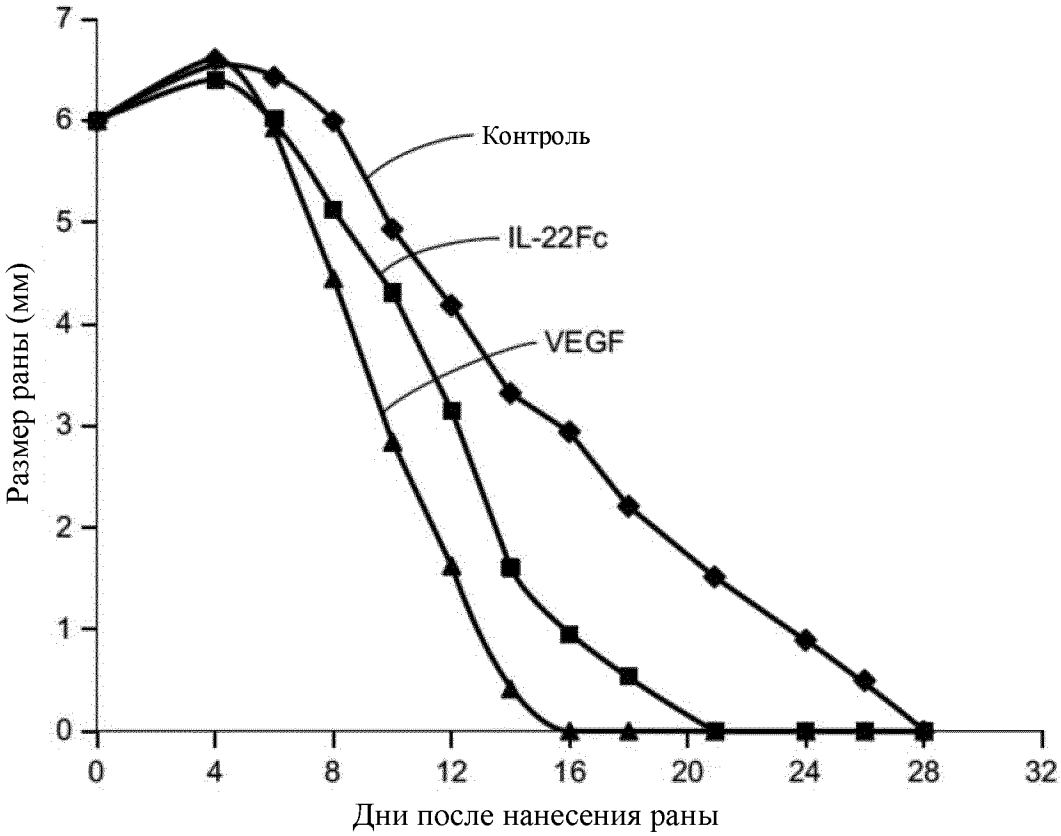
Фиг. 55A



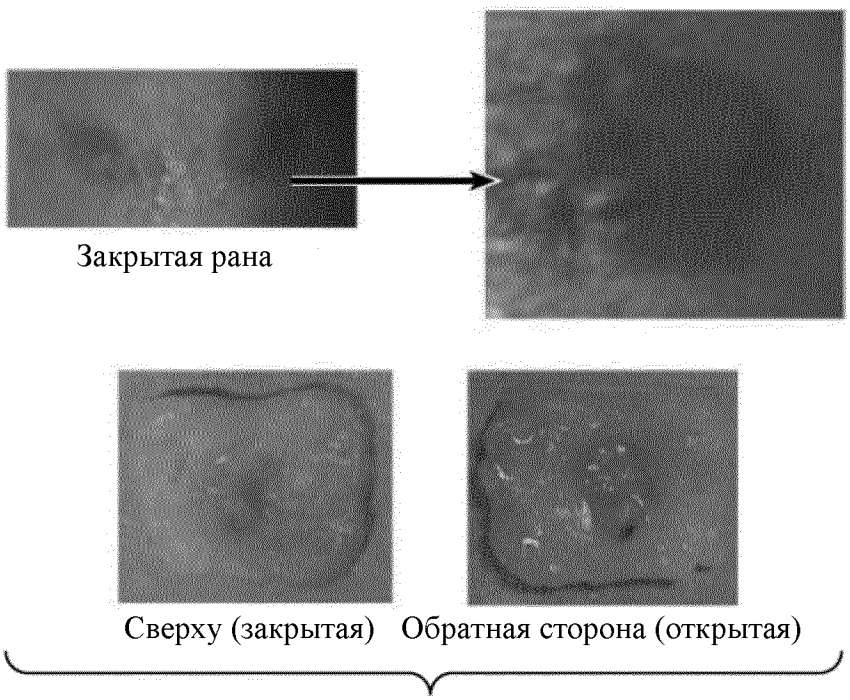
Фиг. 55B



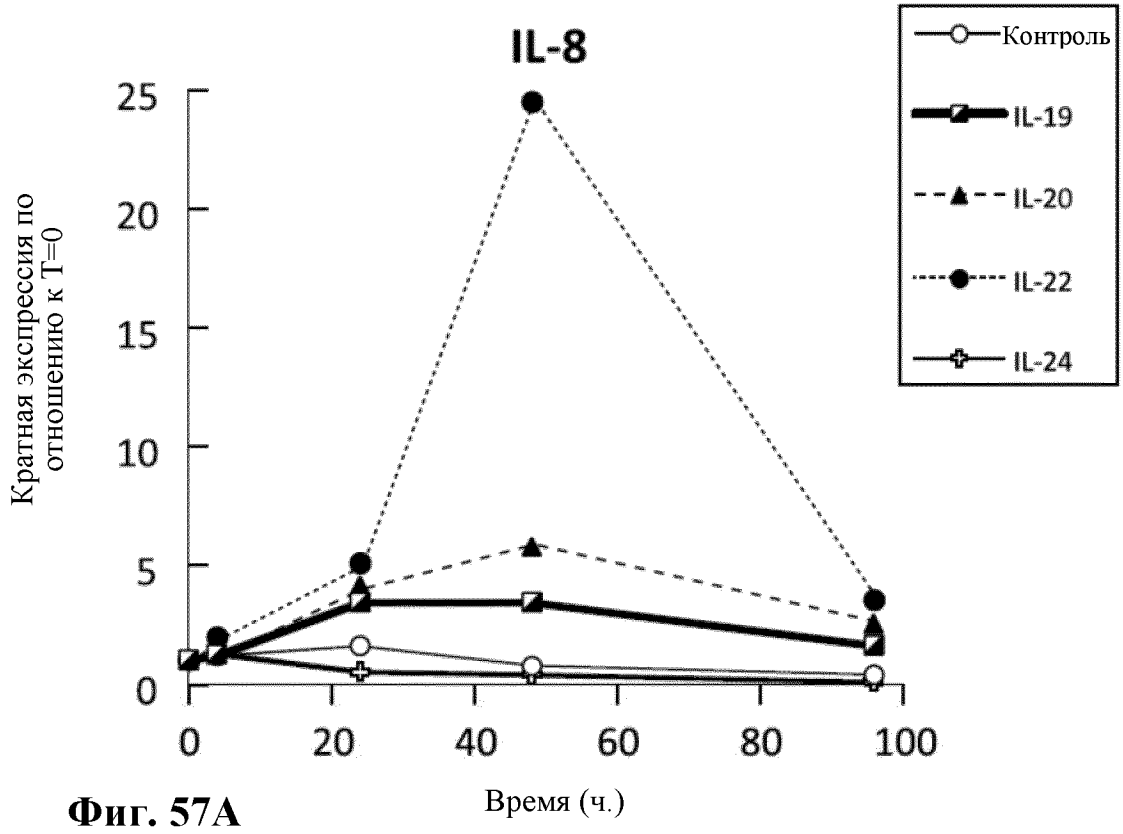
Фиг. 55C



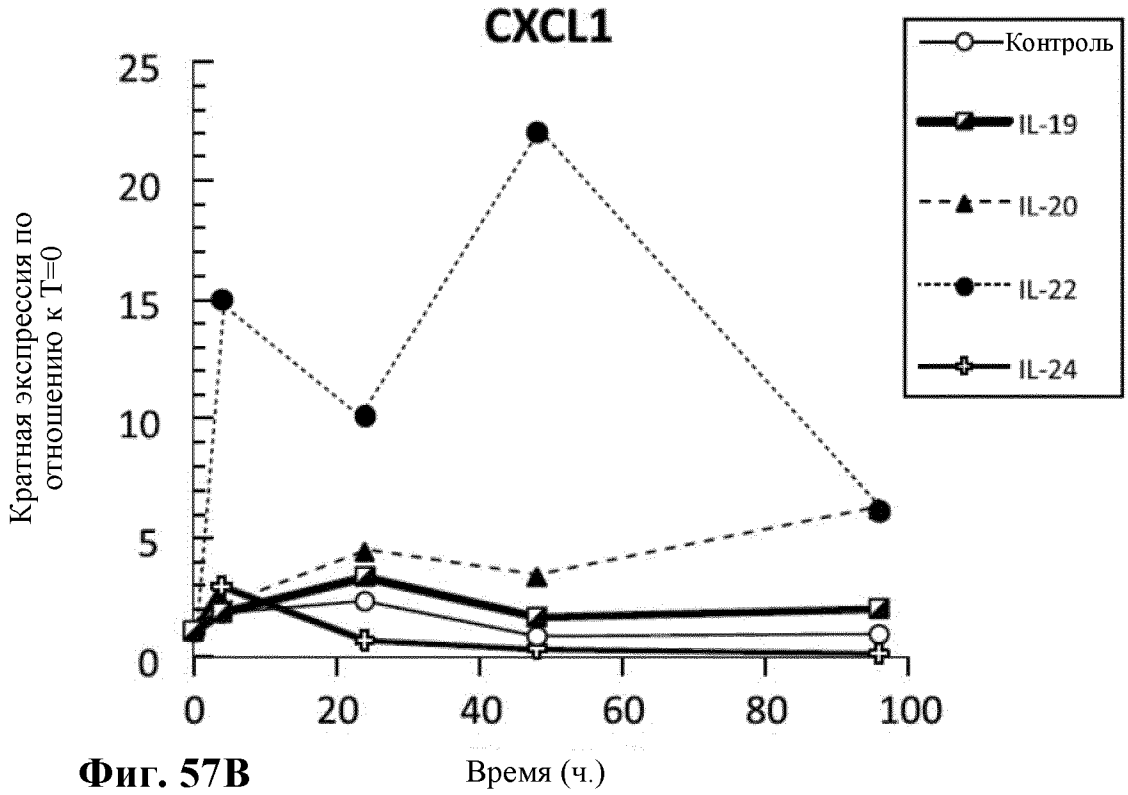
Фиг. 56A



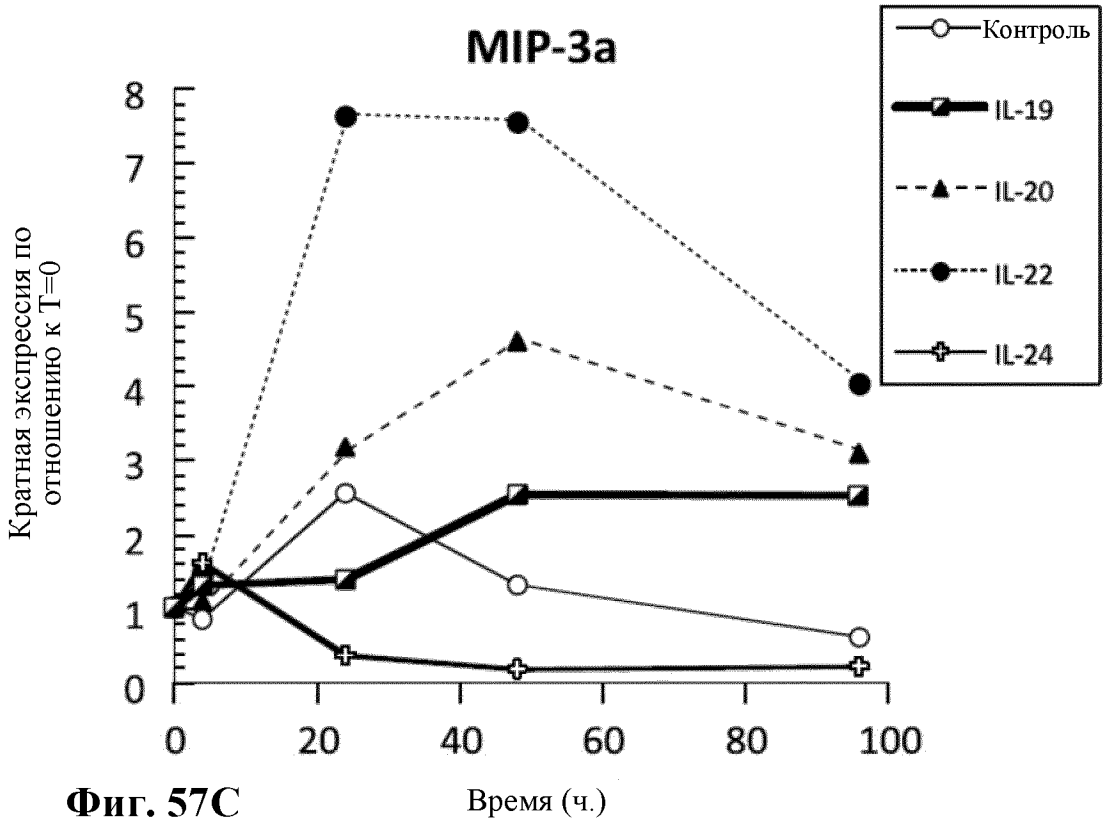
Фиг. 56B



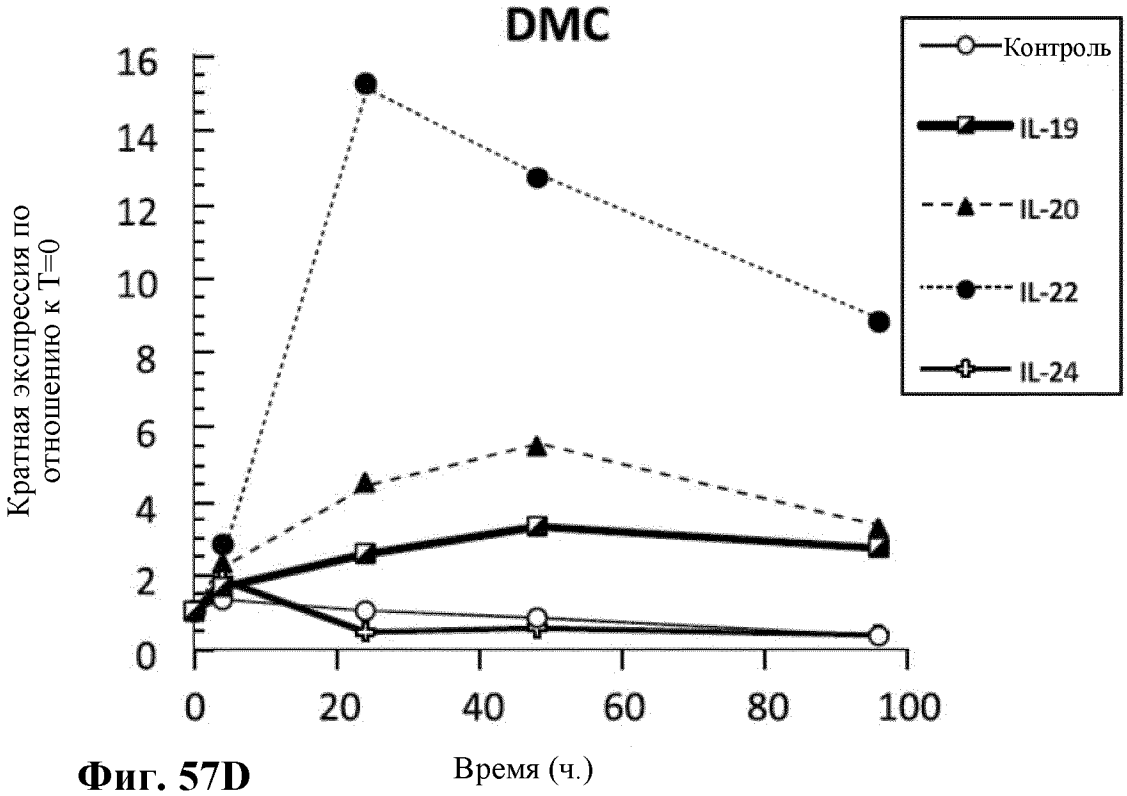
Фиг. 57A



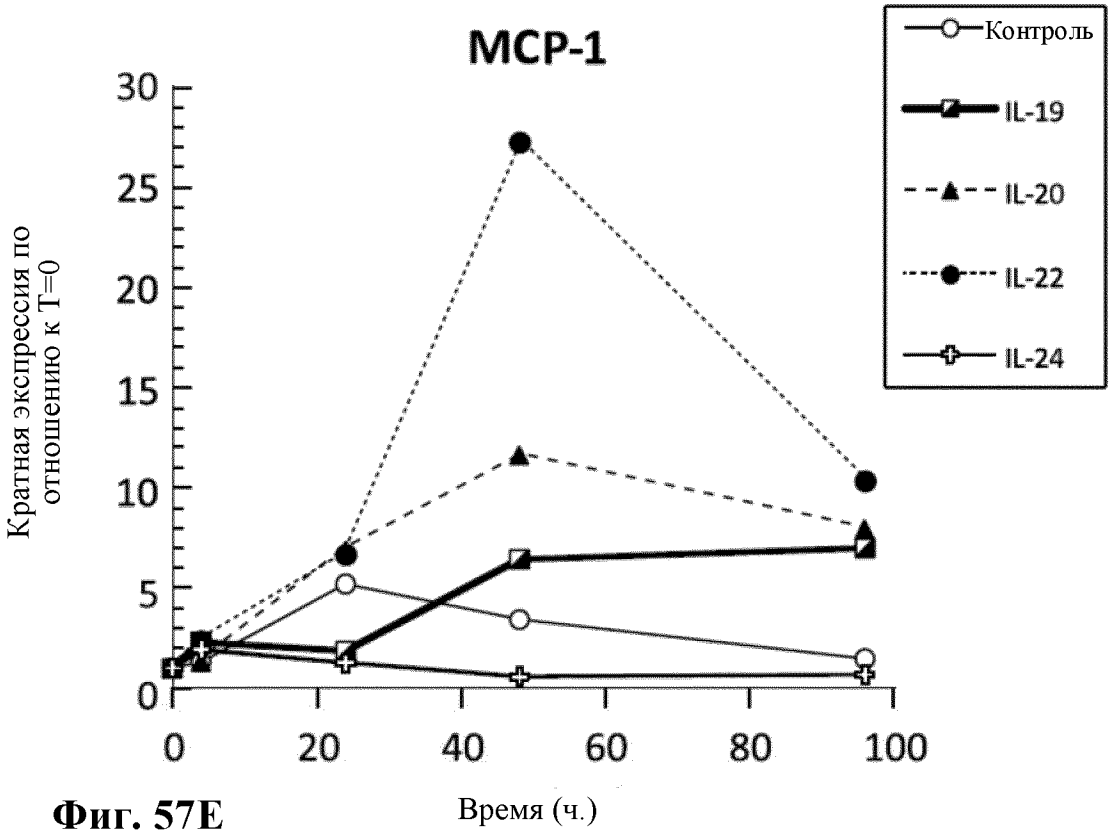
Фиг. 57B



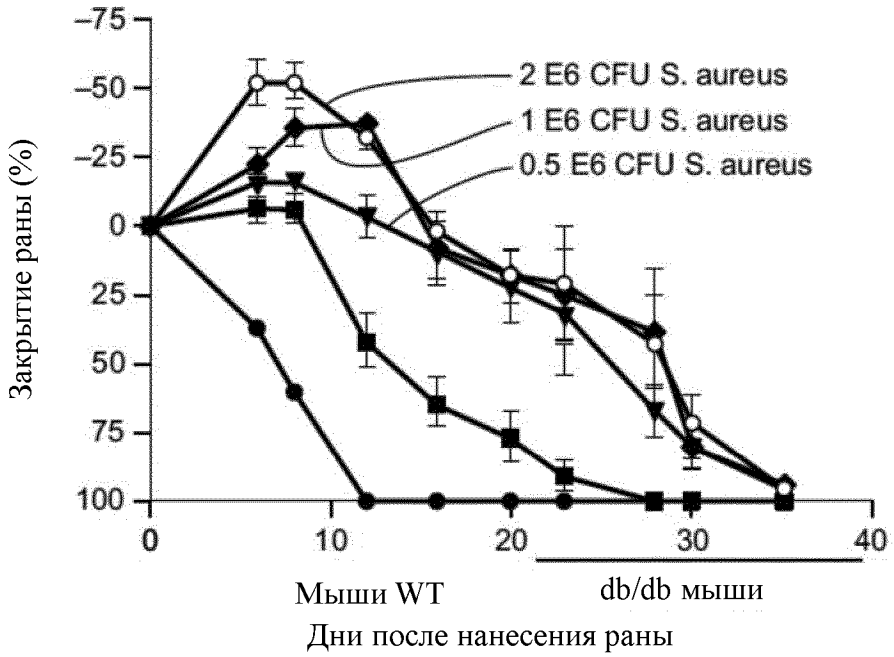
Фиг. 57C



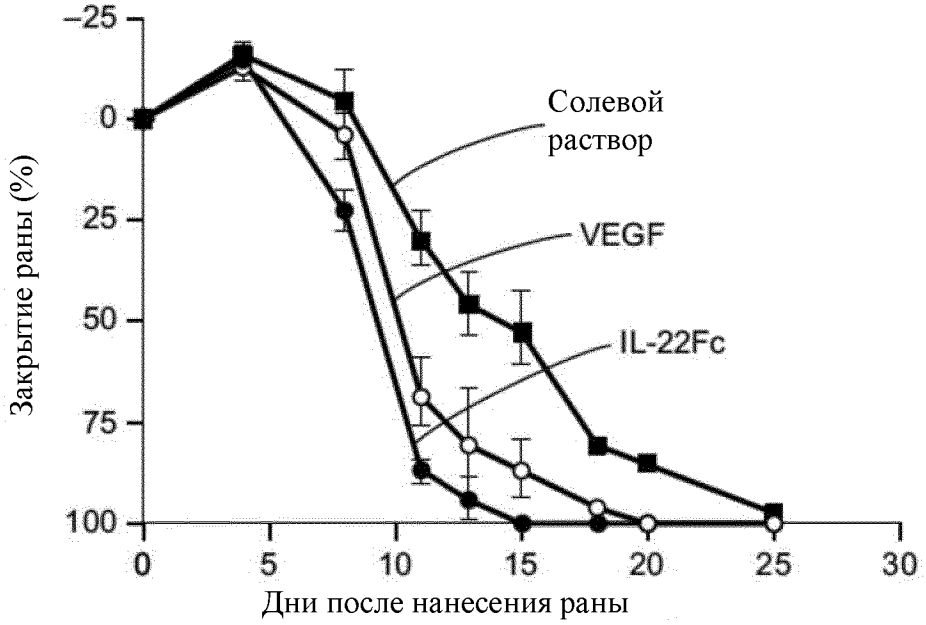
Фиг. 57D



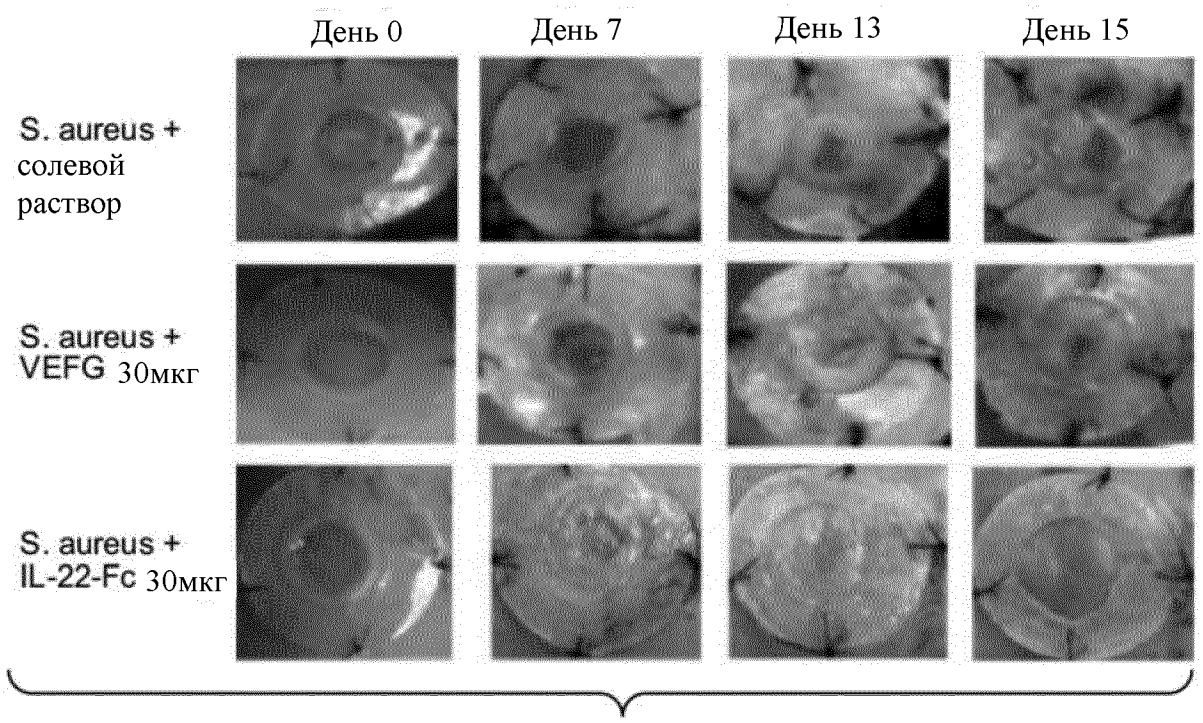
Фиг. 57E



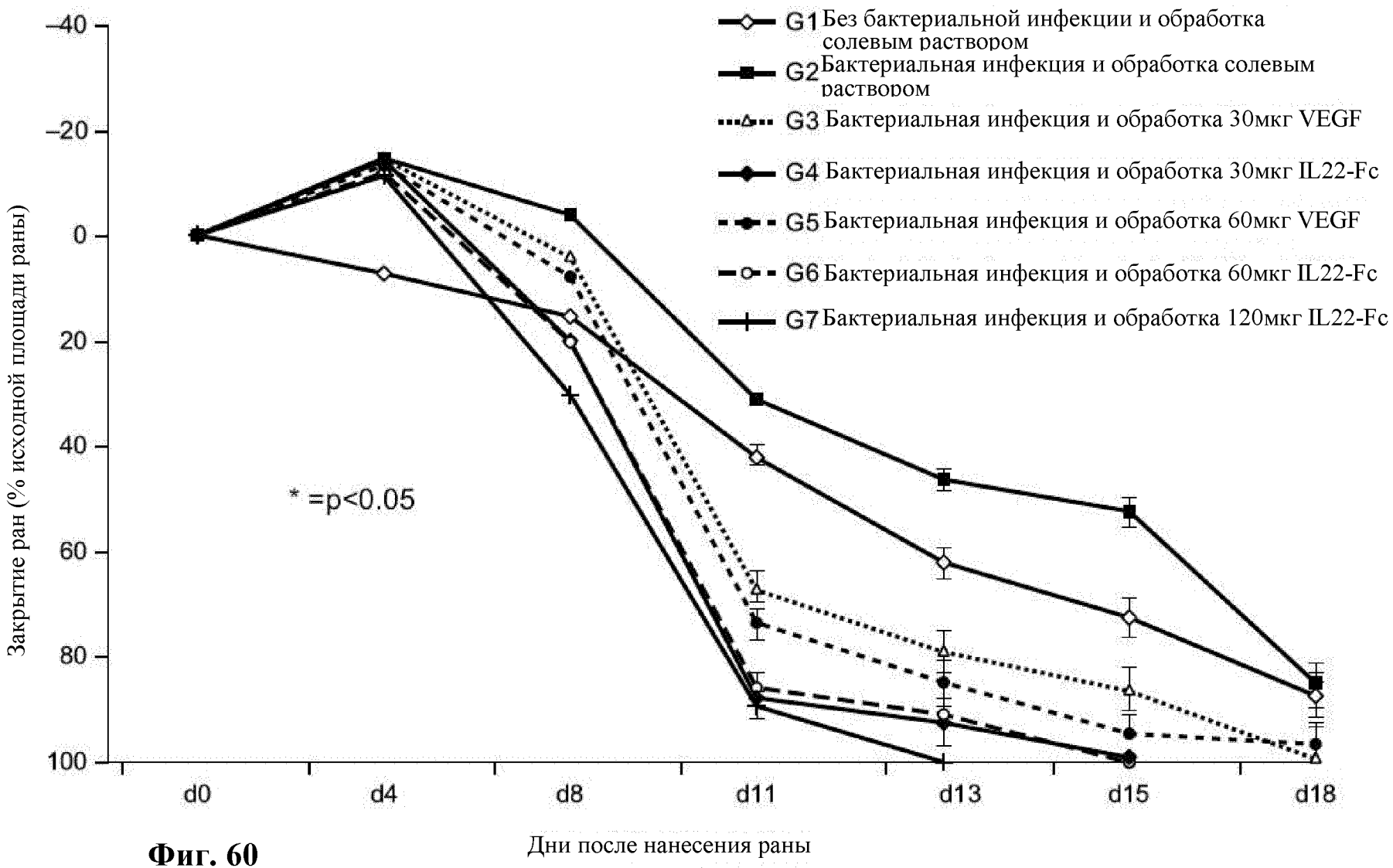
Фиг. 58



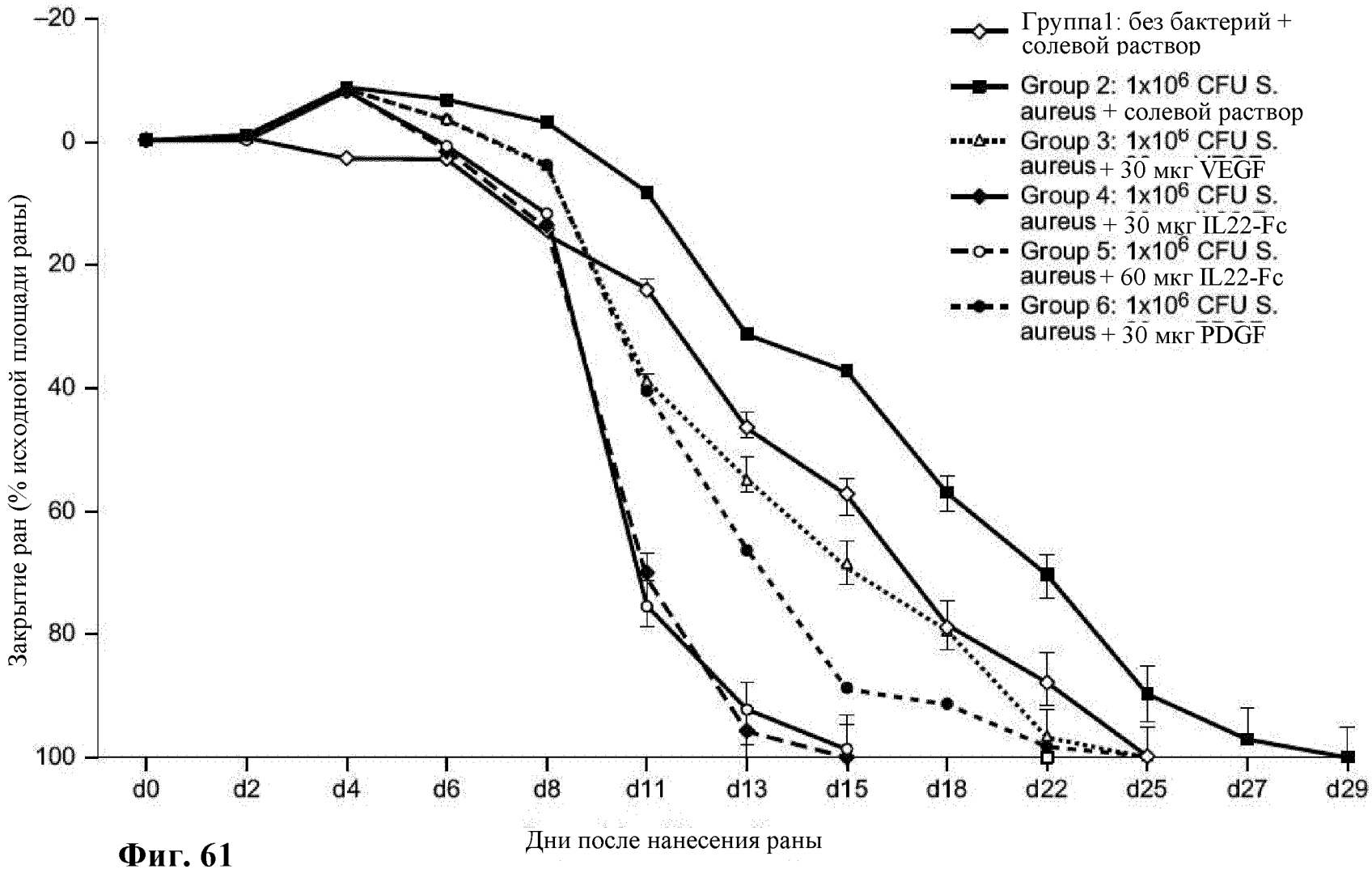
Фиг. 59A



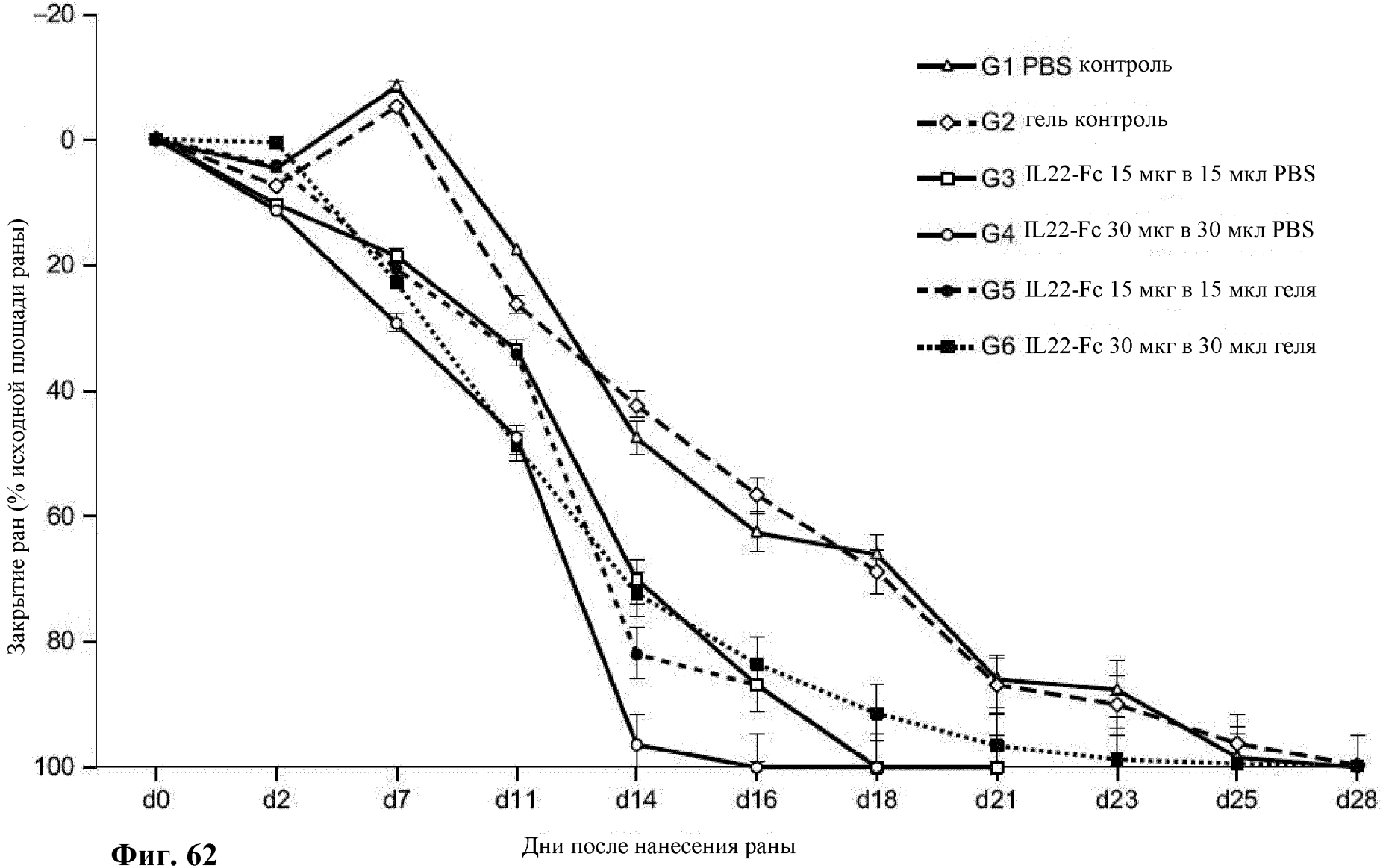
Фиг. 59B


G1 Без бактериальной инфекции и обработка солевым раствором
G2 Бактериальная инфекция и обработка солевым раствором
G3 Бактериальная инфекция и обработка 30мкг VEGF
G4 Бактериальная инфекция и обработка 30мкг IL22-Fc
G5 Бактериальная инфекция и обработка 60мкг VEGF
G6 Бактериальная инфекция и обработка 60мкг IL22-Fc
G7 Бактериальная инфекция и обработка 120мкг IL22-Fc
* =p<0.05
Закрытие ран (% исходной площади раны)
-40
-20
0
20
40
60
80
100
d0
d4
d8
d11
d13
d15
d18
Дни после нанесения раны

Фиг. 60


Группа1: без бактерий + солевой раствор
Group 2: 1x10^6 CFU S. aureus + солевой раствор
Group 3: 1x10^6 CFU S. aureus + 30 мкг VEGF
Group 4: 1x10^6 CFU S. aureus + 30 мкг IL22-Fc
Group 5: 1x10^6 CFU S. aureus + 60 мкг IL22-Fc
Group 6: 1x10^6 CFU S. aureus + 30 мкг PDGF
Закрытие ран (% исходной площади раны)
–20
0
20
40
60
80
100
d0
d2
d4
d6
d8
d11
d13
d15
d18
d22
d25
d27
d29
Дни после нанесения раны

Фиг. 61


G1 PBS контроль
G2 гель контроль
G3 IL22-Fc 15 мкг в 15 мкл PBS
G4 IL22-Fc 30 мкг в 30 мкл PBS
G5 IL22-Fc 15 мкг в 15 мкл геля
G6 IL22-Fc 30 мкг в 30 мкл геля
Закрытие ран (% исходной площади раны)
–20
0
20
40
60
80
100
d0
d2
d7
d11
d14
d16
d18
d21
d23
d25
d28
Дни после нанесения раны

Фиг. 62