



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118843** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2015 08889**

(22) Дата подання заявки: **14.03.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: **25.03.2019**

(31) Номер попередньої  
заявки відповідно до  
Паризької конвенції: **61/800,148,  
61/800,795,  
61/801,144,  
61/821,062,  
61/860,176**

(32) Дата подання  
попередньої заявки  
відповідно до  
Паризької конвенції: **15.03.2013,  
15.03.2013,  
15.03.2013,  
08.05.2013,  
30.07.2013**

(33) Код держави-учасниці  
Паризької конвенції,  
до якої подано  
попередню заявку: **US,  
US,  
US,  
US**

(41) Публікація відомостей  
про заявку: **12.01.2016, Бюл.№ 1**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.03.2019, Бюл.№ 6**

(86) Номер та дата  
подання міжнародної  
заявки, поданої  
відповідно до  
Договору РСТ **PCT/US2014/029652,  
14.03.2014**

(72) Винахідник(и):  
**Шеєр Джастін (US),  
Оуянґ Венжун (US),  
Стефаніч Ерік Гарі (US),  
Вандлен Річард (US),  
Хаас Філіп Е. (US),  
Колумам Ганеш А. (US),  
Ванг Ксяотінґ (US),  
Росс Джек (US),  
ван Брюгген Ніколас (US),  
Лі Вайн П. (US)**

(73) Власник(и):

**ДЖЕНЕНТЕК, ІНК.,**

1 Dna Way, South San Francisco, California  
94080, United States of America (US)

(74) Представник:

**Кістерський Кирило Арсенійович,  
реєстр. №207**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:

WO 2011087986 A1, 21.07.2011

WO 2005063820 A2, 14.07.2005

Xie M-H. et al. Interleukin (IL)-22, a novel human  
cytokine that signals through the interferon receptor-  
related proteins CRF2-4 and IL-22R. Journal of  
biological chemistry. American society for  
biochemistry and molecular biology, US, 2000, vol.  
275, no. 40, P. 31335 – 31339  
Dmitrij Hristodorov et al. With or Without Sugar?  
(A)glycosylation of Therapeutic Antibodies.  
Molecular biotechnology, 2012, vol. 54, no. 3, P.  
1056 - 1068

Beck Alain et al. Trends in glycosylation,  
glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic  
antibodies and Fc-fusion proteins. Current  
pharmaceutical biotechnology, Netherlands, 2008,  
vol. 9, no. 6, P. 482 – 501

Hamako J. et al. Comparative studies of asparagine-  
linked sugar chains of immunoglobulin G from  
eleven mammalian species. Comparative  
biochemistry and physiology. B.  
comparativebiochemistry, Pergamon press, London,  
GB, 1993, vol. 106, no. 4, P. 949 – 954

Shoji-Hosaka Emi et al. Enhanced Fc-dependent  
cellular cytotoxicity of Fc fusion proteins derived  
from TNF receptor II and LFA-3 by fucose removal  
from ASN-linked oligosaccharides. Journal of  
biochemistry, Japanese biochemical society / Oxford  
university press, Tokyo; JP, 2006, vol. 140, no. 6, P.  
777 – 783

Niwa R. et al. IgG subclass-independent  
improvement of antibody-dependent cellular  
cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked  
oligosaccharides. Journal of immunological  
methods, Elsevier science publishers B.V.,  
Amsterdam, NL, 2005, vol. 306, no. 1-2, P. 151 –  
160

Shields Robert L. et al. Lack of fucose on human  
IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to  
human Fcγgamma RIII and antibody-dependent  
cellular toxicity. Journal of biological chemistry,  
American society for biochemistry and molecular  
biology, US, 2002, vol. 277, no. 30, P. 26733 -  
26740

**UA 118843 C2**

**(54) ХИМЕРНИЙ БІЛОК IL-22 Fc ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**

---

**(57) Реферат:**

Винахід стосується химерного білка IL-22, виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує химерний білок, вектора, клітини-хазяїна, фармацевтичної композиції, способу одержання химерного білка, способу застосування фармацевтичної композиції для лікування запальних захворювань.

Дана заявка претендує на пріоритет згідно з попередніми заявками на видачу патенту США з серійними номерами 61/800148, 61/800795 і 61/801144, всі з яких були подані 15 березня 2013 року, попередньою заявкою на видачу патенту США з серійним номером 61/821062, поданою 8 травня 2013 року, і попередньою заявкою на видачу патенту США з серійним номером 61/860176, поданою 30 липня 2013 року, зміст усіх з яких включений в даний документ за допомогою посилання у повному їхньому обсязі.

#### Перелік послідовностей

Дана заявка включає перелік послідовностей, поданий через EFS-Web і, таким чином, включений у даний документ за допомогою посилання у повному його обсязі. Зазначена ASCII-копія, створена 14 березня 2014 року, має назву P5580R1-WO\_Seq\_Listing.txt і розмір, що становить 106763 байт.

#### Область техніки

Даний винахід відноситься до химерних білків IL-22 і IL-22 Fc, агоністів IL-22, композицій, що їх містять, і способів їх одержання, і способу їх застосування.

#### Рівень техніки

Інтерлейкін-22 (IL-22) є представником сімейства цитокіну IL-10, який виробляється Th22 клітинами, NK клітинами, клітинами-індукторами лімфоїдної тканини (LTi), дендритними клітинами та Th17 клітинами. IL-22 зв'язується з рецепторним комплексом IL-22R1/IL-10R2, який експресується у природніх клітинах, таких як епітеліальні клітини, гепатоцити та кератиноцити, і у бар'єрних епітеліальних тканинах деяких органів, включаючи дерму, підшлункову залозу, кишечник і дихальну систему.

IL-22 відіграє важливу роль у захисних властивостях слизових оболонок, опосередковуючи ранній імунний захист від приєднання та переходу в схований стан бактеріальних патогенів. Див. роботу Zheng et al., 2008, Nat. Med. 14:282-89. IL-22 активує вироблення протимікробних пептидів і прозапальних цитокінів із епітеліальних клітин і стимулює проліферацію та міграцію епітеліальних клітин товстої кишки в кишечнику. Див. роботу Kumar et al., 2013, J. Cancer, 4:57-65. При бактеріальній інфекції в нокаутних за IL-22 мишей спостерігали ослаблену регенерацію кишкового епітелію, високе бактеріальне обсіменіння та підвищену смертність. Kumar et al., раніше. Аналогічним чином, інфікування нокаутних за IL-22 мишей вірусом грипу призводило в результаті до сильної втрати маси й ослабленої регенерації клітин трахеального та бронхіального епітелію. Таким чином, IL-22 відіграє прозапальну роль у придушенні мікробної інфекції, а також протизапальну захисну роль у регенерації епітелію при запальних реакціях. Необхідно ще багато чого визначити відносно біологічної дії IL-22, що активує патологічне запалення та відновлення тканин. Суперечливі на вигляд відомості про ефекти IL-22 на епітеліальні клітини все ще до кінця не зрозумілі. Kumar et al., раніше.

Регуляція протимікробних дефензинів, яка обмежує бактеріальну реплікацію та поширення, буде сприяти стабілізації кишкової мікробіоти шляхом зменшення наступного вироблення LPS і збереження цілісності слизової оболонки. IL-22 позитивно регулює експресію гострофазних білків, включаючи SAA, і сприяє експресії ряду генів, асоційованих з гострими запальними реакціями, включаючи IL-6, G-CSF і IL-1a. Системне введення IL-22 здоровішим мишам також позитивно регулює LPS-сполучні білки до фізіологічно релевантних концентрацій для нейтралізації LPS у відповідь на бактеріальну інфекцію.

Підвищену експресію IL-22 виявляють у хворих із запальним порушенням кишечника (IBD). Див., наприклад, Wolk et al., 2007, J. Immunology, 178:5973; Andoh et al., 2005, Gastroenterology, 129:969. IBD, такі як хвороба Крона (CD) і виразковий коліт (UC), приблизно є результатом розрегульованої імунної реакції на симбіотичну мікрофлору, яка присутня в кишці. Cox et al., 2012, Mucosal Immunol. 5:99-109. Як UC, так і CD є комплексними захворюваннями, які зазвичай зустрічаються в генетично сприйнятливих індивідуумів, що зазнають впливу стимулів навколишнього середовища, які поки слабо охарактеризовані. CD і UC опосередковують як загальними, так і різними механізмами та характеризуються різними клінічними ознаками. Див. роботу Sugimoto et al. 2008, J. Clinical Investigation, 118:534-544.

При UC запалення відбувається головним чином у слизовій оболонці товстої кишки та прямої кишки, що призводить до розвитку станів, які виснажують, включаючи діарею, ректальну кровотечу та втрату ваги. Є підстави вважати, що UC переважно обумовлений невідповідною запальною реакцією хазяїна на мікроорганізми кишечника, що проникають через ушкоджений епітеліальний бар'єр (Xavier and Podolsky, 2007, Nature 448:427-434). Хвороба Крона характеризується кишковою інфільтрацією активованих імуніцитів і деформацією структури кишечника. Див. Wolk et al., раніше.

Протягом останніх років зі змінним успіхом був протестований ряд лікарських засобів, заснованих на різних стратегіях регуляції імунної реакції, для лікування IBD, включаючи

стероїди, імуномодулятори й антитіла до запальних цитокінів (Pastorelli et al., Expert opinion on emerging drugs, 2009, 14:505-521). Складна різноманітність флори кишечника вносить свій внесок у гетерогенність захворювання. Таким чином, існує необхідність в удосконалених терапевтичних засобах від IBD.

Серцево-судинне захворювання (CVD) є основною причиною смертності, яка почасти є наслідком атеросклеротичного захворювання більших кровоносних судин. Атеросклероз є основною причиною випадків CVD і являє собою повільне та прогресуюче захворювання, яке є наслідком гіперхолестеринемії та хронічно збуджених кровоносних судин. Атеросклеротичні ушкодження характеризуються ліпідним навантаженням з інфільтрацією імуніцитів, особливо макрофагів і Т-клітин. У цей час допускають, що як уроджені, так і адаптивні імунні механізми беруть участь у прогресуванні та кінцевому тромбозі атерогенної 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).

Гострий панкреатит (AP) є гострим запальним процесом підшлункової залози. Гостре ушкодження нирок (AKI) являє собою різке погіршення ниркової функції, що призводить у результаті до застою сечі й інших азотистих продуктів виділення та дисрегуляції позаклітинного об'єму й електролітів. AKI раніше було відоме як гостра ниркова недостатність. Зміна відображає недавнє визнання того, що навіть невеликі зниження ниркової функції, які не призводять у результаті до очевидної недостатності органа, мають істотне клінічне значення й асоційовані з підвищеною частотою захворювання та смертністю. Залишається необхідність в удосконаленому засобі для лікування від AP і AKI.

Метаболічний синдром є складним станом, що характеризується набором факторів ризику, які вносять свій внесок у розвиток тромбозу, гіпертонії, дисліпідемії та запалення. Резистентність до інсуліну й ожиріння є головними патогенними механізмами, що лежать в основі метаболічного синдрому.

Резистентність до інсуліну підвищує ризик виникнення CVD, тому що вона індукує ендотеліальну дисфункцію, яка, у комбінації з атерогенною дисліпідемією, запаленням і гіпертонією, вносить свій внесок у смертність від хвороби коронарних артерій (CAD). Стійка резистентність до інсуліну також підвищує шанс розвитку цукрового діабету 2 типу (T2DM), незважаючи на те, що атерогенний стан мав місце за багато років до початку T2DM. Таким чином, імовірно, що природне протікання CAD відбувається таким самим шляхом, як T2DM, але починається набагато раніше в житті в схованій формі, займаючи більш довгий період до клінічного прояву, з наявністю цукрового діабету або без нього.

Термін метаболічний ендотоксикоз був створений для опису стану підвищеного LPS у плазмі, індукованого, наприклад, висококалорійним раціоном із високим вмістом жирів (HFD) (Cani et al. 2007. Diabetes 56(7): 1761-72). Миші, яких годували HFD, мають підвищені рівні бактеріального ліпополісахариду (LPS) у плазмі крові, і це підвищення, очевидно, є прямим наслідком підвищеного жиру, що входить у раціон (Cani et al. 2007 раніше; Cani et al. 2008 Diabetes 57(6): 1470-81; Ghoshal et al. 2009, J Lipid Res 50(1): 90-7). Існують переконливі свідчення про те, що кишкова мікробіота займає невід'ємну частину в балансі енергії хазяїна та виході живильних речовин раціону та метаболізмі вуглеводів за рахунок модуляції функції епітеліальних клітин слизової оболонки кишечника (Turnbaugh et al. 2009, J Physiol (Lond) 587(Pt 17): 4153-8; Manco et al. 2010, Endocr Rev 31(6): 817-44). Зміна кишкової мікробіоти, яка відбувається в результаті невідповідного складу жирів у раціоні або надлишку споживаної кількості калорій у раціоні, є загально визнаним ініціатором ожиріння та резистентності до інсуліну, відомих ускладнень серцево-судинного захворювання. Ліпополісахариди виявляють у зовнішній мембрані грам-негативних бактерій, і вони виступають у ролі джерела ендотоксину, яке може викликати сильну імунну реакцію (Barcia et al. Clin Infect Dis 41 Suppl 7: S498-503). Зміни популяції, видів і регіонального поширення кишкової мікробіоти може призвести до змін катаболізму LPS, а раціон із високим вмістом жирів буде сприяти адсорбції LPS через кишковий бар'єр. За таких умов підвищений LPS у системному кровотоці буде індукувати хронічне слабе запалення, активуючи ендогенну захисну реакцію організму з підвищенням рівня ліпідів у плазмі крові, яке при хронічному стані сприяє розвитку індукованого раціоном ожиріння, резистентності до інсуліну й атеросклерозу та наступним випадкам CVD.

Цукровий діабет є серйозним метаболічним захворюванням, яке визначають за наявності постійно підвищених рівнів глюкози в крові (гіперглікемії). Цей стан гіперглікемії є результатом відносного або абсолютного недоліку активності пептидного гормону, інсуліну. Інсулін виробляється та секретується β-клітинами підшлункової залози. Інсулін, як повідомляють, сприяє утилізації глюкози, білковому синтезу й формуванню та збереженню вуглеводної енергії у вигляді глікогену. Глюкоза зберігається в організмі у вигляді глікогену, форми полімеризованої



глюкози, яка може назад перетворюватися в глюкозу для задоволення метаболічних потреб. При нормальних умовах інсулін секретується як з інтенсивністю основного обміну, так і зі збільшеними інтенсивностями після стимуляції глюкозою, все для підтримки метаболічного гомеостазу за допомогою перетворення глюкози в глікоген. Зберігається необхідність у нових еталонних способах лікування атеросклерозу та попередження випадків CVD, метаболічного синдрому, гострого ендотоксикозу й сепсису та пов'язаних з інсуліном порушень.

Загоєння ран є складним процесом, що включає запальну фазу, фазу утворення грануляційної тканини та фазу ремоделювання тканини (див., наприклад, Singer and Clark, Cutaneous Wound Healing, N. Engl. J. Med. 341:738-46 (1999)). Такі явища запускаються цитокінами та факторами росту, які вивільняються в ділянці ушкодження. Багато факторів можуть ускладнювати або перешкоджати нормальному повному загоєнню ран. Наприклад, такі фактори включають вік, інфекцію, недостатнє харчування, імуносупресію, медикаменти, опромінення, цукровий діабет, захворювання периферичних судин, системну хворобу, паління та стрес.

Для суб'єктів із цукровим діабетом широко розповсюдженим ускладненням є хронічне захворювання, що виснажує, розвиток виразки діабетичної стопи (також називається ранюю). Хронічну виразку визначають як рану, що не проходить упорядкований та своєчасний процес відновлення з утворенням анатомічної та функціональної цілісності (див., наприклад, Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994)). За своєю природою виразка діабетичної стопи є хронічною ранюю (American Diabetes Association, Consensus development conference on diabetic foot wound care, Diabetes Care, 22(8):1354-60 (1999)). Оскільки шкіра служить як первинний бар'єр від навколишнього середовища, то відкрита, що не піддається лікуванню, рана може бути катастрофічною; може призвести до загальної інвалідизації (включаючи втрату кінцівки) і навіть до смерті. Діабетична стопа є передвісником для приблизно 85 % ампутацій нижніх кінцівок у людей з цукровим діабетом (див., наприклад, 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 чином, існує потреба у прискореному або поліпшеному загоєнні ран, включаючи загоєння діабетичних ран.

Сутність винаходу

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до химерних білків IL-22 Fc, композицій, що їх містять, і способів їх застосування.

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc, який зв'язується з рецептором IL-22, при цьому зазначений химерний білок IL-22 Fc містить поліпептид IL-22, з'єднаний з Fc ділянкою за допомогою лінкера, причому Fc ділянка містить шарнірну ділянку, домен CH2 IgG і домен CH3 IgG, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, переважно щонайменше 99 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 і SEQ ID NO:14, і причому Fc ділянка не є глікозилованою. Відповідно до деяких варіантів здійснення залишок N297 домена CH2 замінений на гліцин або аланін. Відповідно до інших певних варіантів здійснення залишок N297 замінений на Gly; у той час як відповідно до інших варіантів здійснення залишок N297 замінений на Ala. Відповідно до деяких варіантів здійснення зв'язування з рецептором IL-22 запускає проведення сигналу від рецептора IL-22, включаючи активацію STAT3.

Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 98 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8 або SEQ ID NO:12. Відповідно до інших певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8 або SEQ ID NO:12. Відповідно до інших певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8. Відповідно до інших певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12. Відповідно до деяких варіантів здійснення функції й/або активності химерного білка IL-22 Fc можна аналізувати за допомогою способів *in vitro* або *in vivo*, наприклад, аналізу зв'язування рецептора IL-22, аналізу активності репортерного гена люцеферази Stat3 і тому подібне. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8 або SEQ ID NO:12. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8. Відповідно до деяких варіантів здійснення даний

винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc, отриманого за допомогою способу, що включає етап культивування клітини-хазяїна, здатної експресувати химерний білок IL-22 Fc, в умовах, що підходять для експресії химерного білка IL-22 Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення спосіб додатково включає етап одержання химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину яєчника китайського хом'яка (CHO); у той час як відповідно до інших варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli*.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc, що містить поліпептид IL-22, з'єднаний з Fc ділянкою IgG за допомогою лінкера, причому Fc ділянка містить шарнірну ділянку, домен CH2 IgG і домен CH3 IgG, і причому Fc ділянка не є глікозилованою. Відповідно до деяких варіантів здійснення шарнірна ділянка містить амінокислотну послідовність CPPCP (SEQ ID NO:31). Відповідно до інших певних варіантів здійснення в Fc ділянці замінений залишок N297 і/або в Fc ділянці замінений залишок T299. Відповідно до деяких варіантів здійснення в домені CH2 замінений залишок N297, переважно на гліцин або аланін. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення залишок N297 замінений на гліцин. Відповідно до інших певних варіантів здійснення залишок N297 замінений на аланін. Відповідно до ще одних варіантів здійснення залишок T299 замінений на Ala, Gly або Val. Відповідно до інших певних варіантів здійснення лінкер становить у довжину 8-20 амінокислот, 8-16 амінокислот або 10-16 амінокислот.

Відповідно до деяких варіантів здійснення Fc ділянка містить домен CH2 і CH3 IgG1. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність DKTHT (SEQ ID NO:32). Відповідно до деяких варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність GGGDKTHT (SEQ ID NO:41). Відповідно до деяких варіантів здійснення лінкер становить у довжину щонайменше 11 амінокислот і містить амінокислотну послідовність EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33). Відповідно до інших певних варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність 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) або KVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39). Відповідно до деяких певних варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40). Відповідно до деяких варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність 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) або KVDKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:65). Відповідно до деяких певних варіантів здійснення лінкер не містить амінокислотну послідовність GGS (SEQ ID NO: 45), GGGS (SEQ ID NO:46) або GGGGS (SEQ ID NO:47). Відповідно до окремих варіантів здійснення химерний білок IL-22 IgG1 Fc містить лінкерну послідовність GGGSTHT (SEQ ID NO:63). Відповідно до інших певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 або SE ID NO:14. Відповідно до інших певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12.

Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить домен CH2 і CH3 IgG4. Відповідно до інших певних варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність SKYGPP (SEQ ID NO:43). Відповідно до деяких певних варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність RVESKYGPP (SEQ ID NO:44). Відповідно до деяких варіантів здійснення жоден з лінкерів не містить амінокислотну послідовність GGS (SEQ ID NO:45), GGGS (SEQ ID NO:46) або GGGGS (SEQ ID NO:47). Відповідно до інших певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8 або SE ID NO:10. Відповідно до певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність з SEQ ID NO:8. Відповідно до іншого варіанта здійснення IL-22 Fc химерний білок отриманий за допомогою способу, який включає етап культивування клітини-хазяїна, здатної експресувати химерний білок IL-22 Fc, в умовах, що підходять для експресії химерного білка IL-22 Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc отриманий за допомогою способу, який додатково включає етап одержання химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину яєчника китайського хом'яка (CHO). Відповідно до інших певних варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli*.

Відповідно до ще одного аспекту даний винахід відноситься до композиції, що містить химерний білок IL-22 Fc, причому зазначений химерний білок IL-22 Fc містить поліпептид IL-22, з'єднаний з Fc ділянкою за допомогою лінкера, причому Fc ділянка містить шарнірну ділянку, домен CH2 IgG і домен CH3 IgG, і причому композиція характеризується рівнем афукозилювання в домені CH2 не більше 5 %. Відповідно до деяких варіантів здійснення рівень

афукозилювання становить не більше 2 %, більш переважно менше 1 %. Відповідно до деяких варіантів здійснення рівень афукозилювання вимірюють за допомогою мас-спектрометрії. Відповідно до деяких варіантів здійснення Fc ділянка містить домен CH2 і CH3 IgG4. Відповідно до деяких варіантів здійснення Fc ділянка містить домен CH2 і CH3 IgG1. Відповідно до інших певних варіантів здійснення шарнірна ділянка містить амінокислотну послідовність CPPCP (SEQ ID NO:31). Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:24 або SEQ ID NO:26. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:24. Відповідно до деяких варіантів здійснення композиція отримана за допомогою способу, який включає етапи культивування клітини-хазяїна, здатної експресувати химерний білок IL-22 Fc, в умовах, що підходять для експресії химерного білка IL-22 Fc, і одержання химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища, причому композиція характеризується рівнем афукозилювання в домені CH2 Fc ділянки, що становить не більше 5 %. Відповідно до деяких варіантів здійснення рівень афукозилювання становить не більше 2 %, більш переважно менше 1 %. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc отриманий за допомогою очищення, переважно очищення фукозилованих компонентів від афукозованих компонентів. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc очищений за допомогою афінної хроматографії. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc або композиції, що містить химерні білки IL-22 Fc, причому зазначений химерний білок IL-22 Fc отриманий за допомогою способу, який включає етап культивування клітини-хазяїна, здатної експресувати химерний білок IL-22 Fc, в умовах, що підходять для експресії химерного білка IL-22 Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення спосіб додатково включає етап одержання химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину CHO; у той час як відповідно до інших варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину E. coli.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до композиції, що містить описаний у даному документі химерний білок IL-22 Fc. Відповідно до ще одного аспекту даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить описаний у даному документі химерний білок IL-22 Fc і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій. Відповідно до деяких варіантів здійснення композиція або фармацевтична композиція містить химерний білок IL-22 Fc, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 або SEQ ID NO:26. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення композиція або фармацевтична композиція містить химерний білок IL-22 Fc, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc отриманий за допомогою E. coli. Відповідно до інших певних варіантів здійснення Fc ділянка химерного білка IL-22 Fc не є глікозилованою. Відповідно до деяких додаткових варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc не індукуює антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC). Відповідно до деяких варіантів здійснення фармацевтична композиція додатково містить субоптимальну кількість терапевтичного засобу, такого як дексаметазон. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4.

Додатково, згідно з усіма без винятку аспектами за даним винаходом, відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc може являти собою димерний химерний білок IL-22 Fc (відносно IL-22); у той час як відповідно до інших варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc може являти собою мономерний химерний білок Fc (відносно IL-22).

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до мономерного химерного білка IL-22 Fc. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення мономерний химерний білок містить химерне плече IL-22 Fc і плече Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерне плече IL-22 Fc і плече Fc містить або виступ, або западину в Fc ділянці. Відповідно до деяких варіантів здійснення Fc ділянка химерного плеча IL-22 Fc (мономерна химера IL-22 Fc) містить виступ, а Fc ділянка плеча Fc (мономерний Fc без сполуки з IL-22) містить западину. Відповідно до деяких варіантів здійснення Fc ділянка химерного плеча IL-22 Fc (мономерна химера IL-22 Fc) містить западину, а Fc ділянка плеча Fc (мономерний Fc без сполуки з IL-22) містить виступ. Відповідно до інших певних варіантів здійснення мономерний химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:61 і SEQ ID NO:62. Відповідно до інших певних варіантів здійснення Fc ділянка обох плечей додатково містить мутацію N297G. Відповідно до деяких варіантів здійснення мономерний IL-22 Fc отриманий за допомогою способу, який включає етап культивування однієї або декількох клітин-хазяїнів, що містять одну або декілька

молекул нуклеїнової кислоти, здатних експресувати перший поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:61, і другий поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:62. Відповідно до інших певних варіантів здійснення способу додатково включає етап одержання мономерного химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli*. У відповідності з суміжним аспектом даний винахід відноситься до композиції або фармацевтичної композиції, що містить мономерний химерний білок IL-22 Fc.

Відповідно до ще одного аспекту даний винахід відноситься до виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує описаний у даному документі химерний білок IL-22 Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення нуклеїнова кислота кодує химерний білок IL-22 Fc, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 або SEQ ID NO:26, переважно SEQ ID NO:8 або SEQ ID NO:12, більш переважно SEQ ID NO:8. Відповідно до інших певних варіантів здійснення нуклеїнова кислота містить полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:23 або SEQ ID NO:25. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення нуклеїнова кислота містить полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:7 або SEQ ID NO:11, переважно SEQ ID NO:7. Відповідно до деяких варіантів здійснення виділена нуклеїнова кислота містить полінуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична полінуклеотидній послідовності SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:23 або SEQ ID NO:25. Відповідно до деяких варіантів здійснення виділена нуклеїнова кислота містить полінуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична полінуклеотидній послідовності SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:23 або SEQ ID NO:25, причому виділена нуклеїнова кислота здатна кодувати химерний білок IL-22 Fc, який здатний зв'язуватися з IL-22R і/або запускати активність IL-22R, і причому Fc ділянка химерного білка IL-22 Fc не є глікозилованою. Відповідно до деяких варіантів здійснення виділена нуклеїнова кислота містить полінуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична полінуклеотидній послідовності SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:23 або SEQ ID NO:25, причому виділена нуклеїнова кислота здатна кодувати химерний білок IL-22 Fc, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, 10, 12 або 14. У відповідності з суміжними аспектами даний винахід відноситься до векторів, що містять описану вище нуклеїнову кислоту, і до клітини-хазяїна, що містить такий вектор. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою прокаріотичну клітину або еукаріотичну клітину. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою прокаріотичну клітину, включаючи без обмеження клітину *E. coli*. Відповідно до інших певних варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину, включаючи без обмеження клітину CHO. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн містить вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує химерний білок IL-22 Fc, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.

Відповідно до іншого суміжного аспекту даний винахід відноситься до способів одержання химерного білка IL-22 Fc, які включають етап культивування клітини-хазяїна в умовах, що підходять для експресії химерного білка IL-22 Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення способу додатково включає етап одержання химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища. Химерний білок IL-22 Fc можна одержати з культури клітин або культурального середовища за допомогою будь-яких відомих з рівня техніки способів виділення або очищення білка, включаючи без обмеження збір культурального середовища, заморожування/відтаювання, центрифугування, клітинний лізис, гомогенізацію, фракціонування сульфатом амонію, HPLC і афінну, гель-фільтраційну й іонообмінну колоночну хроматографію. Відповідно до деяких варіантів здійснення способу додатково включає етап видалення афукозилизованого химерного білка IL-22 Fc. Відповідно до інших певних варіантів здійснення афукозилований химерний білок IL-22 Fc видаляють за допомогою афінної колоночної хроматографії. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli*. Відповідно до інших варіантів здійснення клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.

Відповідно до ще одного аспекту даний винахід відноситься до композиції або фармацевтичної композиції, що містить химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 або SEQ ID NO:26. Відповідно до інших варіантів

здійснення Fc ділянка химерного білка IL-22 Fc не є глікозилюваною. Відповідно до деяких варіантів здійснення Fc ділянка химерного білка IL-22 Fc не є глікозилюваною, у той час як поліпептид IL-22 є глікозилюваним. Відповідно до деяких таких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc виробляється в клітинах CHO. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc не індукує антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність. Відповідно до ще одних варіантів здійснення фармацевтична композиція додатково містить дексаметазон або антагоніст TNF. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення дексаметазон або антагоніст TNF є присутнім у субоптимальній кількості.

Відповідно до інших певних варіантів здійснення фармацевтична композиція, що містить химерні білки IL-22 Fc, характеризується рівнем афукозилювання в домені CH2, що становить не більше 5 %, переважно не більше 2 %, більш переважно менше 1 %. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:24 або SEQ ID NO:26, переважно SEQ ID NO:24. Відповідно до інших певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc виробляється в CHO клітинах. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення суб'єктом є людина. Відповідно до деяких варіантів здійснення фармацевтичну композицію вводять системно або застосовують місцево. Відповідно до інших певних варіантів здійснення фармацевтичну композицію вводять внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньочеревинно або застосовують місцево.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить описані в даному документі поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій. Відповідно до деяких варіантів здійснення фармацевтично прийнятний носій являє собою гелеутворюючий засіб. Відповідно до деяких варіантів здійснення гелеутворюючий засіб являє собою полісахарид. Відповідно до деяких варіантів здійснення гелеутворюючий засіб являє собою без обмеження метилцелюлозу, гідроксietилцелюлозу, карбоксиметилцелюлозу, гідроксипропілцелюлозу, блок-співполімер POE-POP, альгінат, гіалуронову кислоту, поліакрилову кислоту, гідроксietилметилцелюлозу або гідроксипропілметилцелюлозу. Відповідно до деяких варіантів здійснення полісахарид являє собою целюлозний засіб, такий як без обмеження гідроксietилметилцелюлоза або гідроксипропілметилцелюлоза. Відповідно до деяких варіантів здійснення гелеутворюючий засіб являє собою гідроксипропілметилцелюлозу. Відповідно до деяких варіантів здійснення фармацевтична композиція призначена для місцевого застосування. Відповідно до деяких варіантів здійснення фармацевтична композиція для місцевого застосування містить поліпептид IL-22. Відповідно до деяких варіантів здійснення фармацевтична композиція для місцевого застосування містить химерний білок IL-22 Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення фармацевтична композиція для місцевого застосування містить поліпептид IL-22 без химери Fc.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способів лікування IBD у суб'єкта, що потребує цього, які включають введення суб'єкту фармацевтичної композиції, що містить химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом. Відповідно до деяких варіантів здійснення IBD являє собою виразковий коліт. Відповідно до інших певних варіантів здійснення IBD являє собою хворобу Крона. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення Fc ділянка химерного білка IL-22 Fc не є глікозилюваною. Відповідно до деяких варіантів здійснення замінений залишок N297 і/або залишок T299 Fc ділянки. Відповідно до деяких варіантів здійснення замінений залишок N297 Fc ділянки. Відповідно до інших певних варіантів здійснення залишок N297 замінений на Gly або Ala, переважно Gly. Відповідно до інших певних варіантів здійснення замінений залишок T299, переважно на Val, Gly або Ala. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 або EQ ID NO:14, переважно SEQ ID NO:8. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc виробляється в клітині E. coli або CHO. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єктом є людина. Відповідно до інших певних варіантів здійснення фармацевтичну композицію вводять внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньочеревинно або застосовують місцево.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способів лікування за допомогою поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc за даним винаходом будь-якого одного або комбінації з наступних захворювань: цукрового діабету II типу, цукрового діабету II типу з патологічним ожирінням, ран (включаючи діабетичні рани та діабетичні виразки), опіків, виразок (включаючи пролежневу виразку та венозну виразку), реакції трансплантат проти хазяїна (GVHD), атеросклерозу, серцево-судинного захворювання, метаболічного синдрому, ендотоксикозу (гострого та легкого), сепсису, гострого коронарного захворювання серця, гіпертонії, дисліпідемії, ожиріння, гіперглікемії, порушень ліпідного метаболізму, гепатиту, гострого гепатиту, ниркової недостатності, гострої ниркової недостатності, гострого ушкодження

нирок, хронічної ниркової недостатності, трансплантації трупних нирок з відстроченою функцією трансплантата, контраст-індукованої нефропатії, панкреатиту, гострого панкреатиту, печінкового фіброзу та легеневого фіброзу. Відповідно до деяких варіантів здійснення гострий панкреатит може являти собою захворювання з легким – помірним – важким ступенем важкості.

Відповідно до деяких варіантів здійснення гострий панкреатит включає захворювання після ERCP (ендоскопічної ретроградної холангіопанкреатографії). Відповідно до деяких додаткових варіантів здійснення хворий, що підлягає лікуванню від вищезгаданого захворювання, потребує зміни його ліпідного профілю HDL/LDL, який поліпептид IL-22 або химерні білки IL-22 Fc можуть змінювати у хворого з підвищенням HDL і зниженням LDL. У відповідності з суміжним аспектом даний винахід відноситься до застосувань поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc при готуванні лікарського препарату для лікування будь-якого одного або комбінацій з вищезгаданих захворювань.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способів інгібування мікробної інфекції в кишечнику або збереження бокалоподібних клітин у кишечнику протягом мікробної інфекції у суб'єкта, що потребує цього, які включають етап введення суб'єкту фармацевтичної композиції, що містить химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом. Відповідно до інших суміжних аспектів даний винахід відноситься до способів підвищення цілісності епітеліальних клітин, загоєння слизової оболонки, проліферації епітеліальних клітин, диференціації епітеліальних клітин, міграції епітеліальних клітин або загоєння епітеліальних ран у кишечнику в суб'єкта, що потребує цього, які включають введення суб'єкту фармацевтичної композиції, що містить химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом. Відповідно до деяких варіантів здійснення епітеліальна клітина являє собою кишкову епітеліальну клітину.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу попередження або лікування серцево-судинного стану, причому стан включає патологію з формуванням атеросклеротичних бляшок. Спосіб включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc. Серцево-судинний стан включає, наприклад, хворобу коронарних артерій, коронарне мікросудинне захворювання, інсульт, захворювання сонної артерії, захворювання периферичних артерій і хронічне захворювання нирок. Спосіб може включати додаткове вповільнення прогресування формування атеросклеротичних бляшок. Спосіб може додатково включати введення одного або декількох додаткових терапевтичних засобів суб'єкту для попередження або лікування серцево-судинного стану.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу лікування метаболічного синдрому. Спосіб включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc. Спосіб може додатково включати зменшення одного або декількох факторів ризику, асоційованих з метаболічним синдромом, у тому числі одного або декількох із центрального ожиріння, гіперглікемії, дисліпідемії та гіпертонії. Спосіб може додатково включати зменшення рівня бактеріального ліпополісахариду (LPS) у суб'єкта. Спосіб може додатково включати введення одного або декількох додаткових засобів суб'єкту для попередження або лікування метаболічного синдрому.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу затримки або вповільнення прогресування атеросклерозу. Спосіб включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc. Спосіб може додатково включати введення одного або декількох додаткових засобів суб'єкту для затримки або вповільнення прогресування атеросклерозу.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу попередження прояву ознаки атеросклерозу. Спосіб включає введення терапевтично ефективної кількості поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc суб'єкту, підданому ризику розвитку атеросклерозу, причому поліпептид IL-22 химерного білка IL-22 Fc ефективний проти розвитку ознаки атеросклерозу. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкт був виявлений як підданий ризику розвитку серцево-судинного стану. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкт генетично підданий ризику розвитку серцево-судинного стану. Відповідно до одного або декількох варіантів здійснення ознаки атеросклерозу включають скупчення бляшок. Відповідно до деяких варіантів здійснення ознаки атеросклерозу включають запалення судин. Спосіб може додатково включати введення одного або декількох додаткових засобів суб'єкту для попередження розвитку ознак атеросклерозу.

Відповідно до ще одного аспекту даний винахід відноситься до способу лікування одного або декількох з гострого ендотоксикозу та сепсису. Спосіб включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc. Спосіб може додатково включати введення одного або декількох додаткових засобів

суб'єкту для лікування одного або декількох з гострого ендотоксикозу та сепсису.

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до способу для прискорення або поліпшення загоєння ран, або як першого, так і другого, у суб'єкта. Спосіб включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc або агоніста IL-22. Відповідно до деяких варіантів здійснення рана являє собою хронічну рану. Відповідно до інших певних варіантів здійснення рана являє собою інфіковану рану. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкт страждає цукровим діабетом, включаючи суб'єкта з цукровим діабетом II типу. Відповідно до одного або декількох варіантів здійснення рана являє собою виразку діабетичної стопи. Відповідно до деяких варіантів здійснення терапевтично ефективну кількість поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc або агоніста IL-22 застосовують до повного закриття рани. Відповідно до деяких варіантів здійснення введення є системним; і відповідно до інших варіантів здійснення введення є місцевим застосуванням. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22, химерний білок IL-22 Fc або агоніст IL-22 перебуває в складі для місцевого застосування. Відповідно до деяких варіантів здійснення склад для місцевого застосування містить поліпептид IL-22 без химери Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення агоніст IL22 вибраний з групи, що складається з поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc, агоніста IL-22, поліпептиду IL-19, химерного білка IL-19 Fc, агоніста IL-19, поліпептиду IL-20, химерного білка IL-20 Fc, агоніста IL-20, поліпептиду IL-24, химерного білка IL-24 Fc, агоніста IL-24, поліпептиду IL-26, химерного білка IL-26 Fc, агоніста IL-26 й агоніста IL-22R1. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення агоніст IL-22 вибраний з групи, що складається з поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc, агоніста IL-22, поліпептиду IL-20, химерного білка IL-20 Fc, агоніста IL-20, поліпептиду IL-24, химерного білка IL-24 Fc й агоніста IL-22R1. Відповідно до деяких варіантів здійснення агоніст IL-22R1 являє собою агоністичне антитіло до IL22R1.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способів лікування метаболічного синдрому, які включають етап введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості одного або декількох агоністів IL-22. Відповідно до деяких варіантів здійснення агоніст IL22 вибраний з групи, що складається з поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc, агоніста IL-22, поліпептиду IL-19, химерного білка IL-19 Fc, агоніста IL-19, поліпептиду IL-20, химерного білка IL-20 Fc, агоніста IL-20, поліпептиду IL-24, химерного білка IL-24 Fc, агоніста IL-24, поліпептиду IL-26, химерного білка IL-26 Fc, агоніста IL-26 й агоніста IL-22R1. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення агоніст IL-22 вибраний з групи, що складається з поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc, агоніста IL-22, поліпептиду IL-20, химерного білка IL-20 Fc, агоніста IL-20, поліпептиду IL-24, химерного білка IL-24 Fc й агоніста IL-22R1. Відповідно до деяких варіантів здійснення агоніст IL-22R1 являє собою агоністичне антитіло до IL22R1. Відповідно до інших певних варіантів здійснення метаболічний синдром являє собою цукровий діабет. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення метаболічний синдром являє собою цукровий діабет II типу.

Відповідно до іншого варіанта здійснення суб'єкту вводять химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єктом є людина. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22 або химерний білок IL22 Fc вводять внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньочеревинно, системно або застосовують місцево.

Відповідно до деяких варіантів здійснення таких аспектів Fc ділянка химерного білка IL-22 Fc не є глікозилюваною. Відповідно до деяких варіантів здійснення замінений залишок N297 і/або залишок T299 Fc ділянки. Відповідно до деяких варіантів здійснення замінений залишок N297 Fc ділянки. Відповідно до інших певних варіантів здійснення залишок N297 замінений на Gly або Ala, переважно Gly. Відповідно до інших певних варіантів здійснення замінений залишок T299, переважно на Val, Gly або Ala. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 або EQ ID NO:14, переважно SEQ ID NO:8. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc виробляється в *E. coli*. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єктом є людина. Відповідно до інших певних варіантів здійснення фармацевтичну композицію вводять внутрішньовенно, підшкірно або застосовують місцево.

Відповідно до інших певних варіантів здійснення фармацевтична композиція, що містить химерні білки IL-22 Fc, характеризується рівнем афукозилювання в домені CH2, що становить не більше 5 %, переважно не більше 2 %, більш переважно менше 1 %. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:24 або SEQ ID NO:26, переважно SEQ ID NO:24. Відповідно до інших певних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc виробляється в CHO клітинах. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення суб'єктом є людина. Відповідно до інших певних варіантів здійснення

фармацевтичну композицію вводять внутрішньовенно, підшкірно або застосовують місцево.

Відповідно до ще одних варіантів здійснення описаних вище аспектів N-глікан, прикріплений до Fc ділянки химерного білка IL-22 Fc, ферментативно видаляють за допомогою гліколітичного ферменту. Відповідно до деяких варіантів здійснення гліколітичним ферментом є пептид-N-глікозидаза (ПНГгаза). Відповідно до деяких певних варіантів здійснення суб'єктом є людина.

Відповідно до ще одного аспекту даний винахід також відноситься до застосувань описаного в даному документі химерного білка IL-22 Fc при готуванні лікарського препарату для лікування IBD, включаючи UC і CD, у суб'єкта, що потребує цього. У відповідності з суміжним аспектом даний винахід відноситься до застосувань описаного в даному документі химерного білка IL-22 Fc при готуванні лікарського препарату для інгібування мікробної інфекції в кишечнику або збереження бокалоподібних клітин у кишечнику протягом мікробної інфекції у суб'єкта, що потребує цього. Відповідно до ще одного аспекту даний винахід відноситься до застосувань описаного в даному документі химерного білка IL-22 Fc при готуванні лікарського препарату для підвищення цілісності епітеліальних клітин, проліферації епітеліальних клітин, диференціації епітеліальних клітин, міграції епітеліальних клітин або загоєння епітеліальних ран у кишечнику в суб'єкта, що потребує цього. Відповідно до інших суміжних аспектів даний винахід відноситься до застосувань поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc при готуванні лікарського препарату для лікування серцево-судинного стану, метаболічного синдрому, атеросклерозу, гострого ушкодження нирок, гострого панкреатиту, прискорення, стимуляції або поліпшення загоєння ран, включаючи без обмеження загоєння хронічної рани, діабетичної рани, інфікованої рани, пролежневої виразки або виразки діабетичної стопи, у суб'єкта, що потребує цього.

Всі без винятку варіанти здійснення можна комбінувати, якщо контекст очевидно не припускає зворотнє. Всі без винятку варіанти здійснення можна застосовувати у відношенні всіх без винятку аспектів за даним винаходом, якщо контекст очевидно не припускає зворотнє.

Конкретні варіанти здійснення за даним винаходом стануть очевидними з наведеного далі більш докладного опису деяких переважних варіантів здійснення та формули винаходу.

Короткий опис креслень

На фігурі 1 показане вирівнювання амінокислотних послідовностей зрілого IL-22 від різних видів ссавців: людини (номер доступу GenBankQ9GZX6, SEQ ID NO:4, шимпанзе (номер доступу GenBankXP\_003313906, SEQ ID NO:48), орангутана (номер доступу GenBank XP\_002823544, SEQ ID NO:49), миші (номер доступу GenBank Q9JJY9, SEQ ID NO:50) і собаки (номер доступу GenBank XP\_538274, SEQ ID NO:51).

На фігурі 2 показані результати мас-спектрометрії статусу глікозилювання Fc ділянки звичайного людського моноклонального IgG1 Fc (секція A), химери IL-22 IgG1 Fc, що містить лінкерну послідовність EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33, секція B), EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40, секція C) і GGGDKTHT (SEQ ID NO:41, секція D) і химери IL-22 IgG4 Fc, що містить лінкерну послідовність RVESKYGPP, без мутації або з мутацією N297G (SEQ ID NO:44, секції E і F, відповідно), і химери IL-22 IgG1 Fc, що містить лінкерну послідовність EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40), з мутацією N297G (секція G).

На фігурі 3 показане вирівнювання послідовностей химери людський IL-22 IgG4 Fc (N297G, повнорозмірна послідовність Fc з Lys на C-кінці, SEQ ID NO:16, без Lys SEQ ID NO:8), химери IL-22 IgG1 Fc (N297G, повнорозмірна послідовність Fc з Lys на C-кінці, SEQ ID NO:20, без Lys SEQ ID NO:12) і IL-22 (SEQ ID NO:4). Показана послідовність IL-22 є зрілою формою без лідерної послідовності. Шарнірна послідовність CPPCP (SEQ ID NO:31) показана в рамці, далі йдуть домени CH2 і CH3. Відзначені заміна N297G і необов'язковий залишок Lys на C-кінці.

На фігурі 4 представлений графік, на якому видні результати STAT3 люциферазного аналізу. Активність люциферази, що стимулюється химерою IL-22 IgG4 Fc або химерою IL-22 IgG1 Fc, вимірювали в клітинах 293, які експресують IL-22R людини. З результатів видно, що в химери IL-22 IgG4 і IL-22 IgG1 Fc спостерігали схожу активність *in vitro*.

На фігурі 5 показані терапевтичні ефекти мишачого химерного білка IL-22 Fc в індукованої декстран сульфат натрієм (DSS) мишачої моделі IBD. Мишачий химерний білок IL-22 Fc поліпшував гістологію товстої кишки в мишей з IBD, індукованої DSS (на фігурі 5B), і поліпшення перетворювали в знижений показник гістології товстої кишки (фігура 5C). Обробка химерним білком IL-22 Fc призводила в результаті до зменшеної втрати маси в мишей у ході обробки у порівнянні з дексаметазоном, у цей час найкращим стандартом терапії в цій моделі (фігура 5A).

На фігурі 6 показана швидкість сироваткового кліренсу людських химерних білків IL-22 IgG4 і IgG1 Fc в яванського макака, якому вводили дозу 0,15 мг/кг і 1,5 мг/кг у день 0 і день 7.

На фігурі 7 показані рівні в сироватці трьох генів IL-22R, що регулюють наступні ланки сигнальних каскадів, у яванських макаків після введення дози в кількості 0,15 мг/кг і 1,5 мг/кг у день 1 і день 8 (такий самий режим дозування, як у день 0 і день 7 на фігурі 6). На фігурі 7A



показані дозозалежні підвищення сироваткового амілоїду А (SAA), на фігурі 7В показані дозозалежні підвищення ліпополісахарид-сполучного білка (LPS-BP), на фігурі 7С показані дозозалежні підвищення RegIII/панкреатит-асоційованого білка (PAP або PancrePAP) після введення IL-22 Fc.

5 На фігурі 8 показані результати мікроКТ з високою роздільною здатністю, на яких видний об'єм атеросклеротичних бляшок у дузі аорти та брахіоцефальної артерії 8 місячної Ldlr-/- Аробес1-/- миші на раціоні з високим вмістом жирів.

На фігурі 9 показано, що Ldlr-/-Аробес1-/- миші були чутливими до стимулів за допомогою раціону, і в них спостерігали значно підвищений рівень атеросклерозу, згідно з результатами вимірювання мікроКТ (А), але лише незначно підвищені рівні LDL у сироватці (В).

На фігурі 10 показана реакція Ldlr-/-Аробес1-/- мишей на стимул, який викликав гостре слабе запалення, з якого видне збільшення MCP-1(А) і IL-6 (В) у сироватці крові, що перевищує спостережувані в мишей C57 дикого типу (wt) і яке супроводжується погіршенням функції судин, за результатами оцінки потік-опосередкованого розширення й інфузії нітрогліцерину (С).

15 На фігурі 11 показано, що постійний вплив ендотоксину призводить до дисліпідемії (А) та більшому об'єму бляшок (В) і нестабільності (С).

На фігурі 12 показано, що рівень глюкози в крові натще зменшувався в групі, обробленої IL-22-Fc, у порівнянні з контролем (А), а кліренс глюкози поліпшувався в результаті обробки IL-22-Fc, що видно з тесту на толерантність до глюкози (В, С).

20 На фігурі 13 показано, що після обробки за допомогою IL-22-Fc відбувається зменшення загального холестерину. В Ldlr-/-Аробес1-/- мишей загальний холестерин підвищувався як в умовах натще, так і в умовах після прийому їжі та зменшувався в групі IL-22-Fc у порівнянні з контролем, за результатами вимірювання наприкінці періоду обробки (А). Рівні тригліцеридів у плазмі крові також зменшувалися при обробці за допомогою IL-22-Fc зі значним зменшенням у стані після прийому їжі (В).

25 На фігурі 14 показано, що гіперліпідемія, яка спостерігалася в Ldlr-/-Аробес1-/- миші, зменшувалася після обробки за допомогою IL-22-Fc. LDL зменшувався як у стані натще, так і в стані після прийому їжі (А), HDL зростав (В), а співвідношення LDL/HDL зменшувалося як у стані натще, так і в стані після прийому їжі (С). vLDL зменшувався в умовах після прийому їжі (D). Результати HDL (Е), LDL (F) і співвідношення LDL/HDL (G) реєстрували через 5 днів для мишей, що одержували дві дози.

На фігурі 15 показано, що рівні LPS у плазмі крові зменшувалися після обробки за допомогою IL-22-Fc.

35 На фігурі 16 показані поліпшені результати вимірювання функції ендотелію за реактивністю судин після обробки за допомогою IL-22-Fc.

На фігурі 17 зображені результати кількісного аналізу об'єму бляшок, виконаного за допомогою мікроКТ з контрастуванням на посмертних зразках висіченої дуги аорти, висхідного та нисхідного відділів аорти (А), брахіоцефальної артерії (В) та клапана аорти (С).

40 На фігурі 18 показані значення маси тіла (А) та споживання їжі (В) після обробки за допомогою IL-22-Fc.

На фігурі 19 зображене схематичне відображення режиму обробки мишачої моделі цукрового діабету.

На фігурах 20А-С показані маса тіла та рівні глюкози в сироватці крові в db/db мишей, в яких спостерігали, що IL-22-Fc значимо зменшував глюкозу в страждаючих ожирінням мишей.

45 На фігурі 21 показано, що обробка за допомогою IL-22Fc поліпшувала толерантність до глюкози та чутливість до інсуліну за результатами тесту на толерантність до глюкози (GTT).  $p < 0,05$

На фігурах 22А-В показано, що обробка за допомогою IL-22Fc поліпшувала чутливість до інсуліну за результатами тесту на толерантність до глюкози (ITT), яку вимірювали за рівнем глюкози мг/дл (А) і % зменшення глюкози (В).

50 На фігурі 23 показано, що IL-22Fc підвищував експресію інсуліну в острівцях. (А) Зелений відображає глюкагон, червоний відображає інсулін. Кругова область, обрамлена червоною лінією, показує площу острівця. Масштабна шкала, 50 мкм. (В) Середня інтенсивність фарбування інсуліну. (С) Середня інтенсивність фарбування глюкагону. (D) Рівні інсуліну після прийому їжі в мишей, яких годували HFD. (Е) Рівні інсуліну натще в мишей, яких годували HFD. (F) IL-22 Fc обертав несприйнятливості до інсуліну в мишей, яких годували HFD.  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ . Величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурах 24А-В показані результати кількісного аналізу інтенсивності інсулінового сигналу у тварин, підданих обробці за допомогою IL-22-Fc.

60 На фігурах 25А-В показано, що інсулін-позитивна площа підвищувалася у тварин, підданих

обробці за допомогою IL-22-Fc, у порівнянні з контролем.

На фігурі 26 показані гістологічні зрізи, на яких видно зниження перипортального жирового гепатозу при обробці за допомогою IL-22-Fc (B) у порівнянні з контролем (A).

На фігурах 27A-B показані результати оцінки IL-22R в HFD-індукованій толерантності до глюкози. (A) Рівні глюкози (мг/дл) через час після ір ін'єкції глюкози. (B) Результати розрахунків загальної площі під кривою (AUC).

На фігурі 28 показана маса мишей KO за рецептором IL-22 у порівнянні з однопослідним контролем.

Фігури 29A-D: Ldlr <sup>-/-</sup>, Apobec1 <sup>-/-</sup> (dko) мишей обробляли за допомогою 50 мкг IL-22Fc або 50 мкг антитіл до антигена амброзії (n=6 на групу) протягом 48 годин. LPS у сироватці крові зменшувався на 50 % (p=0,0052), а LDL/HDL у сироватці крові зменшувалося на 30 % (p=0,049) у мишей, підданих обробці за допомогою IL-22Fc.

На фігурі 30 показана нуклеотидна послідовність кДНК, що кодує нативний IL-22 людини (SEQ ID NO:70).

На фігурі 31 показана амінокислотна послідовність, отримана з послідовності, що кодує, показаної на фіг. 30 (SEQ ID NO:71).

На фігурі 32A показана амінокислотна послідовність химерного білка мишачий IL-22-мишачий-IgG2a (SEQ ID NO:73). На фігурі 32B показана нуклеотидна послідовність, що кодує химерний білок мишачий IL-22-мишачий-IgG2a (SEQ ID NO:72).

На фігурі 33 показано, що відсутність передачі сигналу через IL-22R призводить у результаті до затримки загоєння рани. Рани IL-22R KO мишей гоїлися зі значимою затримкою (p=0,0018 у день 10 і p=0,005 у день 12) у порівнянні з контролем однопослідних мишей WT.

На фігурах 34A-C зображена ранева щілина окремих мишей (n=10) у дні 10, 12 і 15. Показані ілюстративні фотознімки ран як для IL-22R KO мишей, так і для WT у день 14 (D).

На фігурі 35 показане порівняння загоєння ран між контрольними мишами WT (BKS) і страждаючими цукровим діабетом db/db мишами. (A) Загоєння ран в db/db мишей у значній мірі затримувалося протягом періоду дослідження, і рани не гоїлися повністю навіть у день 28. Гістограма у (B) відображає рівень експресії IL-22 у вигляді кратності зміни в мишей дикого типу або db/db мишей через декілька днів після розсічення рани.

Фігура 36 є схематичним представленням схеми дослідження для тестування IL-22-Fc в db/db мишей сумарно в 3 групах (n=7). Антитіло до антигена амброзії застосовували в якості контрольного Fc-білка, а антитіло до FGFR1 застосовували в якості позитивного контролю для регуляції глюкози.

На фігурі 37 показаний IL-22 Fc-нормалізований рівень глюкози після прийому їжі у підданих обробці мишей у порівнянні з контролями від дня 4 до дня 27. Рівні глюкози реєстрували за допомогою глюкометра Onetouch®.

На фігурі 38 графічно показані результати порівняльного вимірювання в раневій щілині IL-22-Fc у порівнянні з 2 контрольними антитілами: антитілом до антигена амброзії й антитілом до FGFR1. Кожна точка на графіку представляє середнє значення для 7 мишей/група.

На фігурах 39A-D показані результати вимірів окремої раневій щілині у дні 15, 19, 21 і день 27. Показані фотографії ілюстративних мишей в день 27 (E).

Фігура 40 є схематичним представленням схеми дослідження для тестування місцевого застосування дози стосовно системного введення дози IL-22-Fc у порівнянні з обробкою контрольним антитілом в db/db мишей; сумарно 3 групи (n=7).

На фігурі 41A-B графічно показані результати порівняльного вимірювання раневій щілині місцевого застосування дози стосовно системного введення дози IL-22-Fc з місцевою обробкою контрольним Fc. Антитіло до антигена амброзії застосовували в якості контрольного Fc антитіла. Кожна точка на графіку представляє середнє значення для 7 мишей/група.

На фігурі 42 за допомогою фотографій показана хірургічно вилучена тканина рани від ілюстративних мишей, на фотографіях показані як вигляд зверху, так і вигляд зі зворотної сторони у день 22 від IL-22-Fc (B) і контрольного антитіла (A).

На фігурі 43A показана стратегія створення IL-22R KO мишей. На фігурі 43B показані результати RT-PCR експресії iPHK IL-22Ra1 у товстій кишці від IL-22R KO і WT мишей. На фігурі 43 C показані результати RT-PCR експресії iPHK Reg3b у товстій кишці від IL-22R KO і WT мишей через 2 дня після введення ін'єкцією однократної дози IL-22 Fc або контрольного IgG. \*\*\*P<0,001. Величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 44 показані результати, з яких видно, що в страждаючих ожирінням мишей виникали дефектні реакції з IL-22. (A-D) Лімфоцити в дренальних лімфатичних вузлах db/db (A-B), DIO (C-D) і контрольних мишей, імунізованих за допомогою OVA/CFA, аналізували відносно експресії IL-22 у день 7 за допомогою проточної цитометрії. Числа на графіках FACS в

(A, C) є відсотком IL-22<sup>+</sup> клітин серед CD4<sup>+</sup>T-клітин. (E-F) db/db, худим контролям, нормальним мишам, яких годували HFD і кормовим раціоном, вводили ін'єкцією флагелін або PBS. Сироватку крові збирали через 2 години. ELISA від IL-22 від db/db і худих контролів (E) і мишей (F), яких годували HFD і кормовим раціоном. Показані дані типові для трьох (A-B) або двох (C-F) незалежних експериментів. N=4 у всіх експериментах. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 45 показані порушення вироблення IL-17 і IL-22 у мишей з дефіцитом за лептиновим сигналом. (A-B) Експресію IL-17A і IL-22 аналізували у день 7 у вигляді відсотка серед CD4<sup>+</sup> клітин в db/db і ob/ob мишей, імунізованих за допомогою OVA/CFA. (C) Результати ELISA IL-22 з надосадової рідини культури очищених наївних WT CD4<sup>+</sup>T-клітин, яких стимулювали в умовах вироблення IL-22 з рекомбінантним мишачим лептином (1 мкг/мл) або без нього. (D) Результати ELISA IL-22 з надосадової рідини Rag2 KO спленоцитів, простимульованих за допомогою IL-23 з рекомбінантним мишачим лептином (1 мкг/мл) або без нього. (E) Результати ELISA сироваткового IL-22 від ob/ob або худих контролів через 2 години після стимуляції флагеліном. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 46 показані результати, з яких видно, що сприйнятливість db/db (ob/ob) мишей до інфікування *S. rodentium* була асоційована з порушенням вироблення IL-22 і відновлювалася під впливом ендогенного IL-22 –Fc. (A) Експресія iPHK IL-22 у товстих кишках від WT, db/db і ob/ob мишей (n=5) після інфікування *S. rodentium*. (B) Маса тіла та (C) виживаність db/db і худих контрольних мишей (n=10), інфікованих *S. rodentium*. (D-E) Гістологія товстої кишки худих контрольних (D) і db/db (E) мишей у день 10, на якій видна гіперплазія епітелію, лущення ентероцитів у просвіт кишки, бактеріальні колонії (стрілки) і набряк підслизової оболонки (вертикальна смужка). Горизонтальна смужка, 200 мкм. (F) Клінічна оцінка, визначена за допомогою гістології товстої кишки (n=5). (G-H) Бактеріальне навантаження в db/db і худих контрольних мишей (n=5) у печінці (G) і селезінці (H) у день 10. (I) Результати ELISA IgG до *S. rodentium* у худих контрольних і db/db мишей (n=5) у день 10. (J). Виживаність худих контрольних або db/db мишей (n=10), підданих обробці за допомогою IL-22–Fc або контрольного IgG після інфікування. Показані дані типові для трьох незалежних експериментів. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 47 показані результати, з яких видно, що діабетичні порушення зменшувалися в результаті обробки за допомогою IL-22–Fc. (A-D) Мишей, яких годували HFD, обробляли за допомогою IL-22–Fc два рази на тиждень (n=10). (A) Рівень глюкози в крові у день 20 (після прийому їжі) і день 21 (16-годинне голодування). (B) Маса тіла у день 30. (C) Тест на толерантність до глюкози у день 21. (D) Тест на толерантність до інсуліну у день 28. Показані дані типові для двох незалежних експериментів. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 48 показані результати, з яких видно, що IL-22 попереджає розвиток діабетичних порушень у мишей, яких годували HFD. (A) маса тіла, (B) рівень глюкози в крові, (C) тест на толерантність до глюкози у день 23, (D) рівень глюкози в крові у день 23 після 16 годин голодування та (E) накопичення черевного жиру в день 25. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 49 показані результати, з яких видно, що IL-22 регулює метаболічний синдром за допомогою множини механізмів. (A-C) Дві групи db/db мишей (n=8) годували їжею без обмеження й обробляли за допомогою контрольного IgG або IL-22–Fc два рази на тиждень. Одну групу db/db мишей (n=8) годували обмеженою їжею, яка збігалася зі споживанням їжі групи, підданої обробці за допомогою IL-22–Fc, і обробляли за допомогою контрольного IgG. Кумулятивне споживання їжі перших восьми днів у мишей, яких годували без обмеження, показане на (A), рівень глюкози в крові на (B) і результати тесту на толерантність до глюкози у день 25 на (C). На (D-E) показані рівні PYY в db/db (D) і HFD (E) мишей, підданих обробці за допомогою IL-22–Fc або контрольного IgG, у день 0 і день 2. Сироватку крові збирали у день 2 перед 2-ю обробкою та в день 5 й аналізували на PYY. На (F) показаний рівень LPS у сироватці крові db/db мишей, підданих обробці за допомогою IL-22–Fc або контрольного IgG, протягом 3 тижнів. (G-I) IL-22R KO (n=9) і WT (n=6) мишей годували за допомогою HFD, починаючи з 6 тижневого віку. Результати маси тіла показані на (G), результати тесту на толерантність до глюкози через 3 місяця годівлі HFD показані на (H) і результати тесту на толерантність до інсуліну через 4 місяця годівлі HFD показані на (I). Показані дані типові для двох (A-C) або трьох (D-I) незалежних експериментів. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 50 показані результати споживання обмеженої їжі в експериментах з однаковим

харчуванням. Три групи db/db мишей годували та піддавали обробці як зазначено на фігурі 49A. Вимірювали кумулятивне споживання їжі.

На фігурі 51 показані результати, з яких видна поліпшена за допомогою IL-22 функція печінки та зменшене накопичення жиру. (A) db/db миші, піддані обробці за допомогою IL-22 Fc або контрольного IgG, як на фігурі 20A. Ферменти печінки вимірювали через один місяць. (B-C) Мишей, яких годували HFD, піддавали обробці за допомогою IL-22 Fc або контрольного IgG, як на фігурі 47A. Ферменти печінки (B) і накопичення черевного жиру (C) вимірювали через один місяць. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, величини помилки, стандартна помилка середнього. (D-H) Мишей годували HFD протягом 10 тижнів, а потім піддавали обробці за допомогою IL-22 Fc або контролю два рази на тиждень протягом 6 тижнів. (D) Експресія гена ліпідного метаболізму з білої жирової тканини. (E) Сироватковий тригліцерид, гліцерин і вільна жирна кислота. (F) Печінковий тригліцерид. (G) Печінковий холестерин. (H) Тригліцерид у білій жировій тканині. (I-J) db/db миші, піддані обробці за допомогою IL-22 Fc або контрольного IgG протягом 4 тижнів. (I) Печінковий тригліцерид. (J) Тригліцерид у білій жировій тканині. \*P<0,05. Величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 52 показані результати, з яких видно, що IL-22 підвищував секрецію інсуліну в  $\beta$ -клітин. db/db мишей обробляли за допомогою IL-22 Fc, як показано на фігурі 20A, підшлункові залози збирали у день 30 і фарбували на інсулін і глюкагон. (A) Відсоток площі острівця в загальній площі підшлункової залози. (B) Відсоток площі  $\beta$ -клітин у загальній площі острівця. (C) Відсоток площі  $\alpha$ -клітин у загальній площі острівця.

Фігура 53: в IL-22 KO мишей не розвивалося порушення толерантності до глюкози при HFD. IL-22 KO мишей годували HFD, починаючи з 6-місячного віку. Тест на толерантність до глюкози здійснювали через 3 місяця після HFD. Величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 54 показані результати, з яких видна сприйнятливість ob/ob мишей до інфікування *S. rodentium*: (A) маса тіла та (B) виживаність ob/ob і худих мишей (n=10), інфікованих *S. rodentium*; (C-D) гістологія товстої кишки контрольних худих (C) і ob/ob мишей (D) у день 8, на якій видні гіперплазія епітелію, лущення ентероцитів у просвіт кишки, бактеріальні колонії (стрілками) і набряк підслизової оболонки (вертикальна смуга) (горизонтальна смуга, 200 мкм); (E) клінічна оцінка, визначена за гістологією товстої кишки (n=5); і (F-G) бактеріальне навантаження в ob/ob і контрольних худих мишей (n=5) у печінці (F) і селезінці (G) у день 8. \*P < 0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001. Величини помилки, стандартна помилка середнього.

На фігурі 55 показані результати db/db мишей, підданих обробці за допомогою IL-22 Fc, IL-20 Fc або IL-24 Fc, (A) маси тіла, (B) рівня глюкози в сироватці крові та (C) тесту на толерантність до глюкози у 20 день обробки.

На фігурах 56A і B показані результати порівняння ефективності загоєння ран в db/db мишей, підданих обробці за допомогою VEGF або IL-22 Fc.

На фігурах 57A-E показане індукування вироблення цитокінів або хемокинів за допомогою IL-22 Fc у реконструйованому епідермісі.

На фігурі 58 показані результати порівняння закриття рани за допомогою моделі рани з накладенням шини в мишей дикого типу та db/db мишей з інфікуванням *S. aureus* або без нього.

На фігурі 59 A і B показані результати порівняння ефективності загоєння ран між VEGF і IL-22 Fc у моделі інфікованої рани з накладенням шини.

На фігурі 60 показані результати порівняння ефективності загоєння ран між VEGF і IL-22 Fc у різних концентраціях у моделі інфікованої рани з накладенням шини.

На фігурі 61 показані результати порівняння ефективності загоєння ран між VEGF, PDGF і IL-22 Fc у різних концентраціях у моделі інфікованої рани з накладенням шини.

На фігурі 62 показано, що IL-22 Fc прискорював загоєння ран у розчині, а також у гелевому складі в моделі рани з накладенням шини.

Докладний опис винаходу

Всі згадані в даному документі публікації, патенти та патентні заявки, таким чином, однозначно включені в даний документ за допомогою посилання для всіх цілей.

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до білка IL-22 або химерних білків IL-22 Fc, композицій, що їх містить, і способів їх застосування. Зокрема, даний винахід відноситься до застосування химерних білків IL-22 Fc або поліпептиду IL-22 при попередженні та лікуванні IBD, атеросклерозу, серцево-судинних захворювань і станів, що характеризуються формуванням атеросклеротичних бляшок, метаболічного синдрому, легкого та гострого ендотоксикозу й сепсису, гострого ушкодження нирок, гострого панкреатиту, помірного гострого панкреатиту та пов'язаних із інсуліном порушень. Додатково, даний винахід відноситься до застосування химерних білків IL-22 Fc або поліпептидів IL-22 при попередженні та лікуванні виразки діабетичної стопи, прискорення загоєння ран і, зокрема, загоєння діабетичних ран.

Відповідно до одного аспекту вважають, що даний винахід відноситься до першого розкриття, в якому показано лікування поліпептидом IL-22 серцево-судинного захворювання як такого. Дані в даному документі підтверджують ідею про те, що поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc можуть зменшувати ріст атеросклеротичних бляшок, зменшувати частоту розриву атеросклеротичних бляшок і зменшувати ендотоксикоз. Даний винахід, зокрема, придатний при лікуванні суб'єктів, що страждають від метаболічного синдрому, слабкого або гострого ендотоксикозу, сепсису та пов'язаних із інсуліном порушень, таких як резистентність до інсуліну (нечутливість до інсуліну), які потребують зміни їх ліпідного профілю HDL/LDL, що може визначити доктор або лікар. У даній заявці наведені дані, які вказують на те, що поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc можуть підвищувати рівень ліпопротеїнів високої щільності (HDL) і знижувати рівень ліпопротеїнів низької щільності (LDL) у таких суб'єктів, які страждають від метаболічного синдрому. Дані, без прив'язки до якої-небудь теорії, також вказують на те, що кишковий LPS є фактором, що призводить до ендотоксикозу й атеросклерозу. Миші, піддані обробці химерним білком mIL-22 Fc, мали зменшену гіперліпідемію, зменшену толерантність до глюкози з відновленою функцією судин, і такі зміни завершувалися зменшенням атеросклеротичної бляшки. Поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc може послабляти прогресування серцево-судинного захворювання.

Крім того, цукровий діабет є хронічним порушенням, що впливає на вуглеводний, жировий і білковий метаболізм у тварин. Цукровий діабет є основною причиною сліпоти, ниркової недостатності й ампутацій нижніх кінцівок у дорослих і є основним чинником ризику серцево-судинного захворювання й інсульту. Цукровий діабет I типу (або інсулін-залежний цукровий діабет ("IDDM") або ювенільний цукровий діабет) становить приблизно 10 % від усіх випадків цукрового діабету. Захворювання характеризується прогресивною втратою функції секреції інсуліну бета-клітинами підшлункової залози. Така характеристика також властива неїдіопатичному, або "вторинному", цукровому діабету, який бере свій початок у захворюванні підшлункової залози. Цукровий діабет I типу асоціюють з наступними клінічними об'єктивними ознаками або симптомами: наприклад, постійно підвищеною концентрацією глюкози у плазмі крові або гіперглікемією; поліурією; полідипсією і/або гіперфагією; хронічними мікросудинними ускладненнями, такими як ретинопатія, нефропатія та невропатія; і макросудинними ускладненнями, такими як гіперліпідемія та гіпертонія, які можуть призвести до втрати зору, ниркового захворювання кінцевої стадії, ампутації кінцівки й інфаркту міокарда.

Цукровий діабет II типу (інсулінонезалежний цукровий діабет або NIDDM, також називаний цукровим діабетом II типу) є метаболічним порушенням (або метаболічним синдромом), що включає дисрегуляцію глюкозного метаболізму й порушену чутливість до інсуліну. Цукровий діабет II типу зазвичай розвивається в зрілому віці й асоційований з нездатністю організму утилізувати або виробляти інсулін у достатній кількості. На додаток до резистентності до інсуліну, що спостерігається в тканинах-мішенях, хворі, що страждають від цукрового діабету II типу, мають відносний дефіцит інсуліну, який складається в тому, що хворі мають рівні інсуліну, нижче прогнозованих для заданої концентрації глюкози у плазмі крові. Цукровий діабет II типу характеризується наступними клінічними об'єктивними ознаками або симптомами: наприклад, постійно підвищеною концентрацією глюкози у плазмі крові або гіперглікемією; поліурією; полідипсією і/або гіперфагією; хронічними мікросудинними ускладненнями, такими як ретинопатія, нефропатія та невропатія; і макросудинними ускладненнями, такими як гіперліпідемія та гіпертонія, які можуть призвести до втрати зору, ниркового захворювання кінцевої стадії, ампутації кінцівки й інфаркту міокарда.

#### I. Визначення

Якщо не зазначено інше, мають на увазі, що всі терміни з області техніки, позначення й інша застосовувана в даному документі наукова термінологія мають значення, що традиційно розуміються фахівцями в даній області, до якої відноситься даний винахід. У деяких випадках терміни з традиційно зрозумілими значеннями визначені в даному документі для ясності та/або для зручності наведення довідок, і включення таких визначень у даний документ не слід обов'язково витлумачувати як представляюче істотну відмінність від того, що зазвичай розуміють у даній області техніки.

У рамках даної заявки, якщо не зазначено інше, використовувані методики можна знайти у будь-якому з декількох добре відомих джерел: 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), і Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Залежно від конкретного випадку, процедури, що включають застосування комерційно доступних наборів і реактивів, зазвичай здійснюють відповідно до визначених виробником

протоколів і/або параметрів, якщо не зазначено інше. Таким чином, перед описом даних способів і застосувань необхідно донести до відома, що даний винахід не обмежений конкретними описаними методологією, протоколами, лініями клітин, видами або родами тварин, конструкціями та реактивами, оскільки вони, звичайно ж, можуть змінюватися. Також слід розуміти, що застосовувана в даному документі термінологія призначена лише для опису конкретних варіантів здійснення та не спрямована на обмеження обсягу даного винаходу, який буде обмежуватися тільки прикладеною формулою винаходу.

Застосовувані в даному документі форми однини включають і форми множини, якщо контекст очевидно не вказує на інше. Наприклад, посилання на "виділений пептид" означає один або декілька виділених пептидів.

За всім даним описом й у формулі винаходу буде зрозуміло, що слово "містять" або такі варіанти, як "містить" або "утримуючий", має на увазі включення зазначеного цілого числа або групи цілих чисел, але не виключення будь-яких інших цілих чисел або групи цілих чисел.

Застосовуваний у даному документі термін "химерний білок IL-22 Fc", або "химерний білок IL-22", або "химерний білок IL-22 Ig" відноситься до химерного білка, в якому білок або поліпептид IL-22 з'єднані прямо або опосередковано з Fc ділянкою IgG. Відповідно до деяких переважних варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом містить людський білок або поліпептид IL-22, з'єднаний з людським Fc ділянкою IgG. Відповідно до деяких варіантів здійснення людський білок IL-22 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4. Проте, зрозуміло, що даним винаходом передбачені варіанти мінорних послідовностей, такі як вставки, делеції, заміни, особливо консервативні амінокислотні заміни IL-22, або Fc, які не впливають на функцію й/або активність химерного білка IL-22 або IL-22 Fc. Химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом може зв'язуватися з рецептором IL-22, що може призвести до проведення сигналу від рецептора IL-22. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc здатний зв'язуватися з рецептором IL-22 і/або здатний призвести до проведення сигналу від рецептора IL-22. Функції й/або активності химерного білка IL-22 Fc можна проаналізувати за допомогою способів, відомих з рівня техніки, включаючи без обмеження, ELISA, аналіз зв'язування ліганд-рецептор і STAT3-люциферазний аналіз. Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc, який зв'язується з рецептором IL-22, зв'язування може призвести до проведення сигналу від рецептора IL-22, причому зазначений химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 і SEQ ID NO:14, і причому Fc ділянка не є глікозилованою. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення Fc ділянка химерного білка IL-22 не має ефекторних активностей (наприклад, не зв'язується з FcγRIIIb), або в нього спостерігають суттєво більш низьку ефекторну активність, ніж у повного антитіла (наприклад, диного типу) IgG. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення Fc ділянка химерного білка IL-22 Fc не викликає цитотоксичність, таку як антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (ADCC) або комплементзалежна цитотоксичність (CDC). Якщо не зазначено інше, "химерний білок IL-22", "химера IL-22 Fc", "химерний білок IL-22 Ig", "химерний білок IL-22 Fc" або "IL-22 Fc" застосовують взаємозамінно за всією даною заявкою.

Застосовуваний у даному документі термін "IL-22", або "поліпептид IL-22", або "білок IL-22" у широкому змісті відноситься до будь-якого нативного IL-22 від будь-якого стосовного до ссавців джерела, включаючи приматів (наприклад, людей) і гризунів (наприклад, мишей і пацюків), якщо не зазначено інше. Термін охоплює "повнорозмірний", непроцесований IL-22, а також будь-які форми IL-22, які виходять у результаті процесингу в клітині. Наприклад, даним винаходом охоплюється як повнорозмірний IL-22, що містить N-термінальну лідерну послідовність, так і зріла форма IL-22. Лідерна послідовність (або сигнальний пептид) може являти собою ендогенну лідерну послідовність IL-22 або екзогенну лідерну послідовність іншого секретованого ссавцем білка. Відповідно до деяких варіантів здійснення лідерна послідовність може бути отримана від еукаріотичного або прокаріотичного секретованого білка. Термін також охоплює варіанти IL-22, що зустрічаються у природі, наприклад, сплайс-варіанти або алельні варіанти. Амінокислотна послідовність ілюстративного людського IL-22 показана в SEQ ID NO:4 (зріла форма, без сигнального пептиду). Відповідно до деяких варіантів здійснення амінокислотна послідовність повнорозмірного білка IL-22 з ендогенною лідерною послідовністю представлена в SEQ ID NO:71; у той час як, відповідно до іншого варіанта здійснення амінокислотна послідовність зрілого білка IL-22 з екзогенною лідерною послідовністю надана в SEQ ID NO:2. Також даним винаходом передбачені варіанти мінорної послідовності, особливо консервативні амінокислотні заміни IL-22, які не впливають на функцію й/або активність IL-22 (наприклад, зв'язування з рецептором IL-22). На фігурі 1 показане вирівнювання амінокислотних

послідовностей зрілого IL-22 від декількох ілюстративних видів ссавців. Зірочки вказують на висококонсервовані амінокислотні залишки серед видів, які, очевидно, важливі для функцій і/або активностей IL-22. Відповідно, відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом містить поліпептид IL-22, що містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентична послідовності SEQ ID NO:4. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення білок IL-22 на 95 % або більше ідентичний послідовності SEQ ID NO:71, на 96 % або більше ідентичний послідовності SEQ ID NO:71, на 97 % або більше ідентичний послідовності SEQ ID NO:71; на 98 % або більше ідентичний послідовності SEQ ID NO:71; на 99 % або більше ідентичний послідовності SEQ ID NO:71. Описані в даному документі поліпептиди IL-22 можна виділити з множини джерел, як наприклад, із тканини людини або з іншого джерела, або одержати за допомогою рекомбінантних або синтетичних способів.

Термін "рецептор IL-22" або "IL-22R" відноситься до гетеродимеру, що складається з IL-22R1 і IL-10R2 або їх алельних варіантів, що зустрічаються у природі. Див. Ouyang et al., 2011, Annu. Rev. Immunol. 29:159-63. IL-10R2 повсюдно експресуються багатьма типами клітин, а IL-22R1 експресується тільки у природніх клітинах, таких як епітеліальні клітини, гепатоцити та кератиноцити. IL-22R1 також відомий як IL-22Ra1 або IL-22R $\alpha$ 1. IL-22R1 можна об'єднати у парі з іншими поліпептидами з формуванням гетеродимерних рецепторів для інших представників сімейства IL-10, наприклад, IL-20 або IL-24. Див., наприклад, Ouyang et al., 2011, раніше.

"Поліпептид з нативною послідовністю IL-22" або "поліпептид з нативною послідовністю IL-22R" відноситься до поліпептиду, що містить таку саму амінокислотну послідовність, як і відповідний поліпептид IL-22 або IL-22R природного походження. Такі поліпептиди IL-22 або IL-22R з нативною послідовністю можна одержати з природного середовища або можна одержати за допомогою рекомбінантних або синтетичних способів. Терміни, зокрема, охоплюють, що зустрічаються у природі, вкорочені або секретовані форми специфічного поліпептиду IL-22 або IL-22R (наприклад, IL-22, в якого відсутній асоційований з ним сигнальний пептид), варіантні форми, що зустрічаються у природі (наприклад, форми, отримані в результаті альтернативного сплайсингу) й алельні варіанти поліпептиду, що зустрічаються у природі. Відповідно до різних варіантів здійснення за даним винаходом поліпептиди IL-22 або IL-22R, що розкриваються в даному документі, з нативною послідовністю являють собою поліпептиди зі зрілою або повнорозмірною нативною послідовністю. Ілюстративний повнорозмірний нативний людський IL-22 показаний на фігурі 30 (ДНК, SEQ IDNO:70) і фігурі 31 (білок, SEQ ID NO:71). Старт- і стоп-кодони показані жирним шрифтом і підкреслені на фігурі 30. Незважаючи на те, що поліпептидні послідовності, що розкриваються у прикладених фігурах, IL-22 і IL-22R показані, що як починаються з метіонінових залишків, позначених у даному документі як амінокислотне положення 1, імовірно й можливо, що інші метіонінові залишки, розташовані до або після амінокислотного положення 1 на фігурах, можна використовувати в якості початкового амінокислотного залишку для поліпептидів IL-22 або IL-22R.

"Варіант IL-22", "варіант IL-22R", "варіантний поліпептид IL-22 поліпептид" або "варіантний поліпептид IL-22R" означають описаний вище активний поліпептид IL-22 або IL-22R, який має амінокислотну послідовність, щонайменше приблизно на 80 % ідентичну повнорозмірній нативній послідовності IL-22 або поліпептидній послідовності IL-22R. Як правило, поліпептидний варіант IL-22 або IL-22R буде мати амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 80 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 81 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 82 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 83 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 84 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 85 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 86 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 87 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 88 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 89 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 90 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 91 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 92 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 93 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 94 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 95 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 96 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 97 % ідентична, альтернативно щонайменше приблизно на 98 % ідентична й альтернативно щонайменше приблизно на 99 % ідентична повнорозмірній або зрілій нативній послідовності IL-22 або поліпептидній послідовності IL-22R.

Термін "Fc ділянка", "домен Fc" або "Fc" відноситься до C-кінцевої антиген-несполучної ділянки імуноглобулінового важкого ланцюга, яка містить щонайменше частину константної ділянки. Термін включає нативні Fc ділянки та варіантні Fc ділянки. Відповідно до конкретних

варіантів здійснення Fc ділянка важкого ланцюга IgG людини триває від Cys226 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Проте, С-кінцевий лізин (Lys447) Fc ділянки може бути присутнім або може бути відсутнім, без впливу на структуру або стабільність Fc ділянки. Якщо в даному документі не зазначено інше, нумерація амінокислотних залишків в IgG або Fc ділянці

5 відповідає системі нумерації EU для антитіл, що також називають EU-нумерація, яка описана в роботі Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Відповідно до деяких варіантів здійснення Fc ділянка відноситься до константної ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну IgG, що містить шарнірну ділянку (починається з Cys226),

10 домен CH2 і домен CH3 IgG. Застосовуваний у даному документі термін "шарнірна ділянка" або "шарнірна послідовність" відноситься до амінокислотної послідовності, розташованої між лінкером і доменом CH2. Відповідно до деяких варіантів здійснення шарнірна ділянка містить амінокислотну послідовність CPPCP (SEQ ID NO:31). Відповідно до деяких варіантів здійснення шарнірна ділянка для химерного білка IL-22 IgG4 Fc містить послідовність CPPCP (SEQ ID

15 NO:31), послідовність, яка зустрічається в нативній шарнірній ділянці IgG1, для полегшення димеризації. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення Fc ділянка починається на шарнірній ділянці та триває до С-кінця важкого ланцюга IgG. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення Fc ділянка являє собою Fc ділянку людського IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення Fc ділянка містить домен CH2 і CH3 IgG4.

20 Відповідно до деяких інших певних варіантів здійснення Fc ділянка містить домен CH2 і CH3 IgG1. Як описано в розділі Приклади, заявниками, на диво, було виявлено, що у химерного білка IL-22 IgG4 Fc спостерігали більш переважаючі фармакокінетичні властивості, ніж у химерного білка IL-22 IgG1 Fc.

Відповідно до деяких варіантів здійснення домен CH2 IgG починається з Ala 231. Відповідно

25 до деяких інших варіантів здійснення домен CH3 починається з Gly 341. Зрозуміло, що С-кінцевий залишок Lys людського IgG може необов'язково бути відсутнім. Також зрозуміло, що обсягом даного винаходу передбачені консервативні амінокислотні заміни в Fc ділянці без впливу на необхідну структуру та/або стабільність Fc.

Відповідно до деяких варіантів здійснення IL-22 з'єднаний з Fc ділянкою за допомогою лінкера. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення лінкер являє собою пептид, який приєднує С-кінець IL-22 до Fc ділянки, як описано в даному документі. Відповідно до деяких варіантів здійснення в лінкерній і/або шарнірній ділянці присутні нативні послідовності IgG для мінімізації та/або щоб уникнути ризику імуногенності. Відповідно до інших варіантів здійснення для полегшення одержання в нативні послідовності можна внести варіанти мінорних послідовностей. Також в обсяг даного винаходу підпадають химерні конструкції IL-22 Fc, що

35 містять екзогенний лінкер або шарнірні послідовності, в яких спостерігають високу активність (вимірювану, наприклад, за допомогою люциферазного аналізу). Відповідно до деяких варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність, яка становить у довжину 8-20 амінокислот, 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,

40 11-16, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або 16 амінокислот. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність DKTHT (SEQ ID NO:32).

Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення лінкер не містить послідовність Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:45), Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:46) або Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:47).

Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить поліпептид IL-22, з'єднаний з Fc ділянкою за допомогою лінкера. Термін "з'єднаний з" або "гібридизований з" відноситься до ковалентного зв'язку, наприклад, пептидного зв'язку, сформованого між двома фрагментами.

Термін "афукозилювання", "афукозилований", "дефукозилювання" або "дефукозилований" відноситься до відсутності або видалення корою фукози з N-глікану, прикріпленого до домена

50 CH2 в Fc.

Зненацька заявниками було виявлено, що химерні білки IL-22 IgG1 Fc, на відміну від інших химерних білків Fc або антитіл, що містять Fc, характеризувалися підвищеними рівнями (наприклад, 30 %) афукозилювання в N-гліканах, прикріплених до Fc ділянки. N-глікани, прикріплені до домена CH2 в Fc, є гетерогенними. Антитіла або химерні білки Fc, що

55 утворюються в CHO клітинах, фукозилюються за допомогою молекул, що мають фукозилтрансферазну активність. Див. Shoji-Hosaka et al., J. Biochem. 2006, 140:777-83. У нормі, у сироватці крові людини можна виявити невеликий відсоток афукозилованих IgG, що зустрічаються у природі. N-глікозилювання Fc є важливим для зв'язування з FcγR; а афукозилювання N-глікану підвищує сполучну здатність Fc у відношенні FcγRIIIa. Підвищене

60 зв'язування FcγRIIIa може підсилити антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність



(ADCC), яка може бути переважною для деяких терапевтичних цілей, що включають застосування антитіл, у яких необхідна цитотоксичність. Див. Shoji-Hosaka et al., раніше. Така посилена ефекторна функція, проте, може бути пагубною у випадку, коли Fc-опосередкована цитотоксичність не є необхідною, як наприклад, у випадку химери IL-22 Fc.

Відомо, що в IgG4 Fc спостерігають меншу ефекторну активність, ніж в IgG1 Fc. Заявники зненацька виявили, що химерний білок IL-22 IgG4 Fc також характеризувався високими рівнями афукозилювання в Fc ділянці. Високий рівень афукозилюваного N-глікану, прикріпленого до Fc в IgG4, може підвищувати небажану ефекторну активність.

Таким чином, відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc, в якому Fc ділянка або домен CH2 не є глікозилюваною. Відповідно до деяких варіантів здійснення сайт N-глікозилювання в домені CH2 є мутованим для попередження глікозилювання.

Відповідно до деяких інших варіантів здійснення глікозилювання в домені CH2 Fc ділянки можна усунути шляхом зміни консенсусного сайту глікозилювання, тобто, Asn у положенні 297, за яким іде будь-який інший амінокислотний залишок (у випадку людського IgG, Ser) і Thr (див. фігуру 3). Сайт глікозилювання можна змінити за допомогою амінокислотних вставок, делецій і/або замін. Наприклад, один або декілька амінокислотних залишків можна вмонтувати між Asn і Ser або між Ser і Thr для зміни вихідного сайту глікозилювання, причому вставки не відновлюють сайт N-глікозилювання. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення залишок N297 (наприклад, N-глікозилюваний сайт в Fc, див. фігуру 3) у домені CH2 людського IgG Fc піддадуть мутації для усунення сайту глікозилювання. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення залишок N297 замінений на Gly, Ala, Gln, Asp або Glu. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення залишок N297 замінений на Gly або Ala. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення залишок N297 замінений на Gly. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення залишок T299 можна замінити на іншу амінокислоту, наприклад, Ala, Val або Gly. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення мутації, які в результаті призводять до аглікозилюваного Fc, не зачіпають структуру та/або стабільність химерного білка IL-22 Fc.

У відповідності з суміжним аспектом даний винахід відноситься до способу лікування IBD, включаючи UC і CD, способів інгібування бактеріальної інфекції в кишечнику, і способів поліпшення цілісності епітелію, проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин у кишечнику, і способів лікування метаболічних порушень або метаболічного синдрому, цукрового діабету II типу, атеросклерозу та загосення діабетичних ран у хворого, що потребує цього, які включають введення хворому фармацевтичної композиції, що містить химерний білок IL-22 Fc, причому Fc ділянка не є глікозилюваною.

У відповідності з наступним аспектом даний винахід відноситься до композиції, що містить химерні білки IL-22 Fc, що мають низький рівень афукозилювання в Fc ділянці або, що не мають його зовсім. Зокрема, даний винахід відноситься до композиції, що містить химерні білки IL-22 Fc, які мають загальний рівень афукозилювання в Fc ділянці, що становить не більше 10 %, переважно не більше 5 %, більш переважно не більше 2 % і найбільше переважно менше 1 %. Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способів лікування IBD, включаючи UC і CD, способів інгібування бактеріальної інфекції в кишечнику, і способів поліпшення цілісності епітелію, проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин у кишечнику, і способів лікування метаболічних порушень, цукрового діабету II типу, цукрового діабету II типу з патологічним ожирінням, реакції трансплантат проти хазяїна (GVHD), атеросклерозу, серцево-судинного захворювання, метаболічного синдрому, ендотоксикозу (гострого та слабкого), сепсису, гострого коронарного захворювання серця, гіпертонії, дисліпемії, ожиріння, гіперглікемії, порушень ліпідного метаболізму, гепатиту, гострого гепатиту, ниркової недостатності, гострої ниркової недостатності, гострого ушкодження нирок, хронічної ниркової недостатності, панкреатиту, гострого панкреатиту, печіночного фіброзу та легеневого фіброзу, рани, інфікованої рани, прискорення загосення ран, включаючи загосення діабетичних ран у хворого, що потребує цього, які включають введення хворому фармацевтичної композиції, що містить химерні білки IL-22 Fc, які мають рівень афукозилювання в Fc ділянці, що становить не більше 10 %, переважно не більше 5 %, більш переважно не більше 2 % і найбільше переважно менше 1 %.

Термін “% афукозилювання” відноситься до рівня афукозилювання в Fc ділянці в композиції химерних білків IL-22 Fc. % афукозилювання можна виміряти за допомогою мас-спектрометрії (MS) і представити як відсоток афукозилюваних гліканових компонентів (компоненти без фукози на одному домені Fc (мінус 1) і на обох доменах Fc (мінус 2)) у порівнянні з усією сукупністю химерних білків IL-22 Fc. Наприклад, % афукозилювання можна розрахувати як відсоток

об'єднаної площі під піком мінус 1 фукоза та піком мінус 2 фукози від загальної площі всіх гліканових компонентів, аналізованих за допомогою MS, наприклад, обумовлених за допомогою мас-спектрометра Agilent 6520B TOF, як описано на фігурі 2 і у показаних нижче прикладах. Рівень афукозилювання можна виміряти за допомогою будь-яких інших підходящих способів, відомих з рівня техніки, включаючи без обмеження HPLC-Chip Cube MS (Agilent) і звернено-фазову HPLC. % афукозилювання композиції IL-22 Fc можна застосовувати в якості фактора для визначення того, чи буде композиція з деякою ймовірністю призводити до розвитку неприйнятного рівня ADCC, невідповідного для поставлених цілей. Відповідно, у відповідності з деякими конкретними варіантами здійснення композиція містить химерні білки IL-22 Fc, що мають рівень афукозилювання, що становить не більше 10 %, переважно не більше 5 %, більш переважно не більше 3 % і найбільше переважно не більше 1 %. Відповідно до деяких варіантів здійснення композиція містить химерні білки IL-22 Fc, що мають рівень афукозилювання, що становить не більше 10 %, не більше 9 %, не більше 8 %, не більше 7 %, не більше 6 %, не більше 5 %, не більше 4 %, не більше 3 %, не більше 2 % або не більше 1 %.

Відповідно до деяких варіантів здійснення необхідний рівень афукозилювання IL-22 Fc композиції можна досягти за допомогою способів, відомих з рівня техніки, у тому числі без обмеження за допомогою очищення. Наприклад, фукозиловані компоненти в композиції можна збагачувати за допомогою афінної хроматографії зі смолами, кон'югованими з фукоза-сполучним компонентом, таким як антитіло або лектин, специфічний до фукози, особливо фукози, яка присутня на 1-6 зв'язку. Див., наприклад, Kobayashi et al, 2012, J. Biol. Chem. 287:33973-82. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення фукозиловані компоненти можна збагатити та відокремити від афукозилованих компонентів за допомогою антитіла специфічного до фукози в колонці для афінної хроматографії. Альтернативно або додатково, афукозиловані компоненти можна відокремлювати від фукозилованих компонентів за різною афінністю зв'язування з FcγRIIIa за допомогою афінної хроматографії.

Відповідно до деяких інших варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить Fc ділянку, в якій залишок N297 у домені CH2 є мутованим. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення залишок N297 замінений на Gly або Ala, переважно на Gly. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення залишок N297 вилучений. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc, що містить Fc, який має амінокислотну заміну в N297, є аглікозилованим або не є глікозилованим. Застосовуваний у даному документі термін "аглікозилований" відноситься до білка або частини білка, що представляє інтерес, який не є глікозилованим. Наприклад, химерний білок IL-22 Fc з аглікозиловою Fc ділянкою можна одержати за допомогою мутагенезу залишку N297 у домені CH2 в Fc ділянці.

Відповідно до іншого варіанта здійснення N-глікан, прикріплений до залишку N297 дикого типу, можна вилучити ферментативно, наприклад, за допомогою деглікозилювання. Підходящі гліколітичні ферменти включають без обмеження пептид-N-глікозидазу (PNGазу).

Термін "димерний химерний білок IL-22 Fc" відноситься до димеру, в якому кожен мономер включає химерний білок IL-22 Fc. Термін "мономерний химерний білок IL-22 Fc" відноситься до димеру, в якому один мономер включає химерний білок IL-22 Fc (плече IL-22 Fc), у той час як інший мономер включає Fc ділянку без поліпептиду IL-22 (плече Fc). Відповідно, димерний химерний білок IL-22 Fc є бівалентним щодо зв'язування IL-22R, у той час як мономерний химерний білок IL-22 Fc є моновалентним щодо зв'язування IL-22R. Гетеродимеризацію мономерного химерного білка IL-22 Fc можна полегшити за допомогою способів, відомих з рівня техніки, включаючи без обмеження гетеродимеризацію за допомогою методики виступ-в-западину (knob-into-hole). Спосіб побудови та складання за методикою виступ-в-западині можна виявити, наприклад, у патентних документах US5821333, US7642228, US 2011/0287009 і PCT/US2012/059810, включених, таким чином, за допомогою посилання в повному їхньому обсязі. Таку методику розробили шляхом внесення "виступу" (або випинання) за допомогою заміни невеликого амінокислотного залишку на великий залишок у домені CH3 одного Fc і внесення "западини" (або поглиблення) у домен CH3 іншого Fc за допомогою заміни одного або декількох більших амінокислотних залишків на менші. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерне плече IL-22 Fc містить виступ, і одне плече Fc містить западину.

Переважні залишки для формування виступу зазвичай являють собою амінокислотні залишки, що зустрічаються у природі, і переважно вибрані з аргініну (R), фенілаланіну (F), тирозину (Y) і триптофану (W). Найбільш переважними є триптофан і тирозин. Відповідно до одного варіанта здійснення вихідний залишок для формування виступу має невелику величину бічного ланцюга, наприклад, аланін, аспарагін, аспарагінова кислота, гліцин, серин, треонін або валін. Ілюстративні амінокислотні заміни в домені CH3 для формування виступу включають без обмеження заміну T366W, T366Y або F405W.

Переважні залишки для формування западини зазвичай являють собою амінокислотні залишки, що зустрічаються у природі, і переважно вибрані з аланіну (A), серину (S), треоніну (T) і валіну (V). Відповідно до одного варіанта здійснення вихідний залишок для формування западини має більшу величину бічного ланцюга, наприклад, тирозин, аргінін, фенілаланін або триптофан. Ілюстративні амінокислотні заміни в домені CH3 для створення западини включають без обмеження заміни T366S, L368A, F405A, Y407A, Y407T і Y407V. Відповідно до деяких варіантів здійснення виступ містить заміну T366W, а западина містить заміни T366S/L368A/Y407V. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення Fc ділянка мономерного химерного білка IL-22 Fc містить Fc ділянку IgG1. Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення мономерний гібрид IL-22 IgG1 Fc містить плече з виступом IL-22 Fc і плече з западиною Fc. Відповідно до деяких варіантів здійснення плече з виступом IL-22 Fc містить заміну T366W (SEQ ID NO:61), а плече з западиною Fc містить T366S, L368A і Y407V (SEQ ID NO:62). Відповідно до деяких інших варіантів здійснення Fc ділянка обох плечей додатково містить мутацію N297G або N297A. Відповідно до деяких варіантів здійснення мономерний химерний білок IL-22 Fc експресується в клітинах E. coli. Зрозуміло, що даною заявкою також передбачаються й охоплюються інші відомі з рівня техніки модифікації Fc ділянки, які полегшують гетеродимеризацію.

Термін "рана" відноситься до ушкодження, особливо до такого, при якому шкіра або інша зовнішня поверхня є рваною, колотою, різаною або інакше ушкодженою.

Термін "виразка" відноситься до місця ушкодження на шкірі або слизуватій оболонці, яке найчастіше характеризують утворенням гною, омертвінням тканини та часто супроводжується запальною реакцією.

Застосовуваний у даному документі термін "кишечник" або "кишка" у широкому змісті охоплює тонкий кишечник і товстий кишечник.

Термін "прискорення загоєння ран" або "збільшення швидкості загоєння ран" відноситься до підвищення швидкості загоєння, наприклад, зменшення часу до повного закриття рани або зменшення часу до досягнення % зменшення площі рани.

"Діабетична рана" являє собою рану, яка асоційована з цукровим діабетом.

"Діабетична виразка" являє собою виразку, яка асоційована з цукровим діабетом.

"Хронічна рана" відноситься до рани, яка не гоїться. Див., наприклад, Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994). Хронічні рани включають без обмеження, наприклад, артеріальні виразки, діабетичні виразки, пролежневі виразки або пролежні, венозні виразки і тому подібне. Гостра рана може розвинути в хронічну рану. Гострі рани включають без обмеження рани, викликані, наприклад, термічним ушкодженням (наприклад, опік), травму, хірургічний надріз, видалення великої злоякісної пухлини шкіри, глибокі грибні та бактеріальні інфекції, васкуліт, склеродерму, пемфігус, токсичний епідермальний некроліз і тому подібне. Див., наприклад, Buford, Wound Healing and Pressure Sores, Healingwell.com, published on: October 24, 2001. Таким чином, відповідно до деяких варіантів здійснення хронічна рана являє собою інфіковану рану.

"Нормальна рана" відноситься до рани, яка зазнає нормального відновлення при загоєнні рани.

"Акцепторна людська каркасна ділянка" у контексті даного винаходу є каркасною ділянкою, що містять амінокислотну послідовність каркасної ділянки варіабельного домена легкого ланцюга (VL) або каркасної ділянки варіабельного домена важкого ланцюга (VH), отриманою від людської імунoglobulinової каркасної ділянки або людської консенсусної каркасної ділянки, як визначено нижче. Акцепторна людська каркасна ділянка, "отримана від" людської імунoglobulinової каркасної ділянки або людської консенсусної каркасної ділянки, може містити таку саму амінокислотну послідовність, або вона може містити зміни амінокислотної послідовності. Відповідно до деяких варіантів здійснення число амінокислотних змін становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. Відповідно до деяких варіантів здійснення акцепторна людська каркасна ділянка VL є ідентичною послідовності людської імунoglobulinової каркасної ділянки VL або послідовності людської консенсусної каркасної ділянки.

"Афінність" відноситься до сили сумарних нековалентних взаємодій між однією ділянкою зв'язування в молекули (наприклад, ліганду або антитіла) і його партнером по зв'язуванню (наприклад, рецептором або антигеном). Якщо не зазначено інше, застосовуваний у даному документі термін "афінність зв'язування" відноситься до природньої афінності зв'язування, яка відображає 1:1 взаємодію між членами пари зв'язування (наприклад, химерним білком IL-22 Fc і рецептором IL-22). Афінність молекули X стосовно її партнера Y можна в цілому представити за допомогою константи дисоціації (Kd). Афінність можна виміряти за допомогою загальноприйнятих у даній області способів, включаючи описані в даному документі. Конкретні

наочні й ілюстративні варіанти здійснення для оцінки афінності зв'язування описані далі.

Термін "антитіло" у даному документі застосовують у найбільш широкому змісті, і він охоплює різні структури за типом антитіл, у тому числі без обмеження моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл за умови, що в них спостерігають необхідну антигенсполучну активність.

"Фрагмент антитіла" відноситься до відмінної від інтактного антитіла молекули, яка містить частину інтактного антитіла, що зв'язується з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіла включають без обмеження Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; діатіла, лінійні антитіла, молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv) і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

"Антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом", що й еталонне антитіло, відноситься до антитіла, яке блокує зв'язування еталонного антитіла з його антигеном у конкурентному аналізі на 50 % або більше, і навпаки, еталонне антитіло блокує зв'язування антитіла з його антигеном у конкурентному аналізі на 50 % або більше. Ілюстративний конкурентний аналіз наведений у даному документі.

Термін "химерне" антитіло відноситься до антитіла, в якого частина важкого та/або легкого ланцюга походить від конкретного джерела або виду, у той час, як інший важкий та/або легкий ланцюг походить від іншого джерела або виду.

"Клас" антитіла відноситься до типу константного домена або константної ділянки, що міститься в його важкому ланцюзі. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і деякі з них можна додатково підрозділити на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> і IgA<sub>2</sub>. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобуліну, називають α, δ, ε, γ і μ, відповідно.

Використовуваний у даному документі термін "цитотоксичний засіб" відноситься до речовини, яка інгібує клітинну функцію або перешкоджає їй і/або призводить до загибелі або руйнуванню клітини. Цитотоксичні засоби включають без обмеження радіоактивні ізотопи (наприклад, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> і радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні засоби або лікарські засоби (наприклад, метотрексат, адриаміцин, алкалоїди барвінку (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі засоби), інгібітори росту, ферменти та їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти, антибіотики, токсини, такі як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибного, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти та/або варіанти, і розкриті нижче різні протипухлинні та протиракові засоби.

"Ефекторні функції" або "ефекторні активності" відносяться до таких біологічних активностей, які пов'язані з Fc ділянкою антитіла та варіюють залежно від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: зв'язування C1q і комплементозалежну цитотоксичність (CDC), зв'язування рецепторів Fc, антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC), фагоцитоз, даун-регуляцію рецепторів на клітинній поверхні (наприклад, рецептора В-клітин) і В-клітинну активацію. Відповідно до деяких варіантів здійснення у химерного білка IL-22 Fc не спостерігають якої-небудь ефекторної функції або якої-небудь обумовленої ефекторної функції. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc характеризується суттєво зменшеною ефекторною функцією, наприклад, приблизно на 50 %, 60 %, 70 % 80 % або 90 % зменшеною ефекторною функцією.

"Ефективна кількість" або "терапевтично ефективна кількість" засобу, наприклад, фармацевтичного складу, відноситься до кількості, ефективної при дозуваннях і протягом періодів часу, необхідних для досягнення необхідного терапевтичного або профілактичного результату.

Наприклад, у випадку серцево-судинного захворювання або стану, терапевтично ефективну кількість поліпептиду IL-22, химерного білка або агоніста може зменшити ступінь формування атеросклеротичних бляшок; зменшити розмір атеросклеротичної бляшки (бляшок); інгібувати (тобто сповільнити до певного ступеня та переважно зупинити) атеросклеротичну бляшку; інгібувати (тобто сповільнити до певного ступеня та переважно зупинити) тромбоз або розрив атеросклеротичної бляшки; і/або полегшити певною мірою один або декілька з симптомів, асоційованих із таким захворюванням або станом.

Під "зменшити або інгібувати" мають на увазі здатність викликати загальне зниження переважно на 20 % або більше, більш переважно на 50 % або більше і найбільше переважно на 75 %, 85 %, 90 %, 95 % або більше. Зменшення або інгібування може відноситися до симптомів захворювання, що піддається лікуванню, наявності або розміру атеросклеротичних бляшок або числу атеросклеротичних бляшок.

"Субоптимальна кількість" відноситься до кількості, менше оптимальної кількості, терапевтичного засобу, що зазвичай застосовується для певного лікування. Якщо суб'єкту дають два терапевтичні засоби, або одночасно, або послідовно, то кожний терапевтичний засіб можна давати в субоптимальній кількості у порівнянні з лікуванням, коли кожний терапевтичний засіб дають окремо. Наприклад, відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкту, що потребує лікування IBD, вводять фармацевтичну композицію, що містить химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом і дексаметазон у субоптимальній кількості.

"Каркасна ділянка" або "FR" відноситься до залишків варіабельного домена, відмінних від залишків гіперваріабельної ділянки (HVR). FR варіабельного домена зазвичай складається з чотирьох FR доменів: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, послідовності HVR і FR зазвичай представлені у наступній послідовності у VH (або VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" та "ціле антитіло" використовують у даному документі взаємозамінно для позначення антитіла зі структурою, практично схожою зі структурою нативного антитіла, або з важкими ланцюгами, які містять описувану в даному документі Fc ділянку.

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїнів" і "культура клітин-хазяїнів" використовують взаємозамінно, і вони означають клітини, в які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяїни включають "трансформантів" і "трансформовані клітини", які включають первинно трансформовану клітину й отримане від неї потомство без обліку числа пересіювань. Трансформована клітина включає тимчасово або стабільно трансформовану клітину. Потомство може не бути повністю ідентичним за вмістом нуклеїнових кислот з батьківською клітиною, але може містити мутації. Даний винахід відноситься до мутантного потомства, яке характеризується такою самою функціональною або біологічною активністю, за якою проводять скринінг або відбір у первісно трансформованій клітині. Відповідно до деяких варіантів здійснення клітина-хазяїн є тимчасово трансформованою за допомогою екзогенної нуклеїнової кислоти. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення клітина-хазяїн є стабільно трансформованою за допомогою екзогенної нуклеїнової кислоти.

"Людське антитіло" є антитілом, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає послідовності антитіла, вироблюваного людиною або людською клітиною або отриманою від джерела, відмінного від людини, яка використовує репертуар людських антитіл або інші, що кодують людське антитіло послідовності. Таке визначення людського антитіла, зокрема, виключає гуманізоване антитіло, що містить антигенсполучні залишки, відмінні від людських.

"Людська консенсусна каркасна ділянка" є каркасною ділянкою, яка демонструє амінокислотні залишки, що найбільше часто зустрічаються, при відборі людських імунoglobulinових каркасних послідовностей VL або VH. Як правило, відбір людських імунoglobulinових послідовностей VL або VH походить з підгрупи послідовностей варіабельних доменів. Як правило, підгрупа послідовностей є підгрупою згідно з Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Відповідно до одного варіанта здійснення для VL підгрупою є підгрупа kappa I згідно з Kabat et al., раніше. Відповідно до одного варіанта здійснення для VH підгрупою є підгрупа III згідно з Kabat et al., раніше.

"Гуманізоване" антитіло відноситься до химерного антитіла, що містить амінокислотні залишки з відмінних від людських HVR і амінокислотні залишки з людських FR. Відповідно до деяких варіантів здійснення гуманізоване антитіло буде містити практично все з щонайменше одного, і, як правило, двох, варіабельних доменів, у яких усі або практично всі з HVR (наприклад, CDR) відповідають таким з відмінного від людського антитіла, усі або практично всі з FR відповідають таким з людського антитіла. Гуманізоване антитіло необов'язкове може містити щонайменше частину константної ділянки антитіла, отриману з людського антитіла. "Гуманізована форма" антитіла, наприклад, відмінного від людського антитіла, відноситься до антитіла, яке було піддано гуманізації.

Застосовуваний у даному документі термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" відноситься до кожної з ділянок варіабельного домена антитіла, які є гіперваріабельними за послідовністю ("визначальні комплементарність ділянки" або "CDR"), і/або формують структурно обумовлені петлі ("гіперваріабельні петлі"), і/або містять контактуючі з антигеном залишки ("антигенні контакти"). Зазвичай антитіла містять шість HVR: три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). Ілюстративні HVR у даному документі включають:

(а) гіперваріабельні петлі, що зустрічаються в амінокислотних залишках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(b) CDR, що зустрічаються в амінокислотних залишках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-

35b (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(с) антигенні контакти, що зустрічаються в амінокислотних залишках 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) і 93-101 (H3) (Maccallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996));

5 і

(d) комбінації (a), (b) і/або (с), що включають амінокислотні залишки 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) і 94-102 (H3).

Якщо не зазначено інше, залишки HVR й інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) пронумеровані в даному документі відповідно до Kabat et al., раніше.

10 "Імунокон'югат" являє собою антитіло або фрагмент антитіла, кон'юговані з однією або декількома гетерологічними молекулами, включаючи без обмеження цитотоксичний засіб.

"Індивідуум", "суб'єкт" або "хворий" є ссавцем. Ссавці включають без обмеження одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак і коней), приматів (наприклад, людей і інших приматів, таких як макаки), кроликів і гризунів (наприклад, мишей і пацюків).

15 Відповідно до деяких варіантів здійснення індивідуумом, суб'єктом або хворим є людина.

"Виділений" химерний білок IL-22 є білком, який відокремили від середовища клітини-хазяїна, який рекомбінантно виробляє химерний білок. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 очищений до ступеня чистоти, що перевищує 95 % або 99 %, за допомогою, наприклад, електрофорезу (наприклад, SDS-PAGE, ізоелектричного фокусування (IEF), капілярного електрофорезу) або хроматографії (наприклад, іонообмінної або звернено-фазової HPLC).

20 "Виділена" нуклеїнова кислота означає молекулу нуклеїнової кислоти, яка була відділена від компонента його природнього оточення. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які зазвичай містять молекулу нуклеїнової кислоти, але молекула нуклеїнової кислоти присутня поза хромосою або в місці розташування на хромосомі, яке відрізняється від його природнього місця розташування на хромосомі.

"Виділена нуклеїнова кислота, що кодує химерний білок IL-22 Fc", відноситься до однієї або декількох молекул нуклеїнової кислоти, що кодує химерний білок IL-22 Fc, у тому числі до такої молекули (молекул) нуклеїнової кислоти в одному векторі або роздільних векторах, такої молекули (молекул) нуклеїнової кислоти, яка тимчасово або стабільно трансфікована в клітину-хазяїна, і такої молекули (молекул) нуклеїнової кислоти, які є присутніми в одному або декількох положеннях у клітині-хазяїні.

35 Термін "керуючі послідовності" відноситься до послідовностей ДНК, необхідних для експресії функціонально зв'язаної кодуючої послідовності в конкретному організмі-хазяїні. Керуючі послідовності, які підходять для прокариотів, наприклад, включають промотор, необов'язково операторну послідовність та ділянку зв'язування рибосом. Відомо, що еукаріотичні клітини використовують промотори, сигнали поліаденілювання й енхансери.

40 Нуклеїнова кислота є "функціонально зв'язаною", коли вона розташована у функціональному взаємозв'язку з іншою послідовністю нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК для послідовності-попередника або секреторної лідерної послідовності функціонально пов'язана з ДНК для поліпептиду, якщо вона експресується як білок-попередник, який бере участь у секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язані з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; або ділянка зв'язування рибосом функціонально пов'язана з кодуючою послідовністю, якщо вона розташована так, щоб сприяти трансляції. Як правило, "функціонально зв'язаний" означає, що послідовності ДНК, що піддаються сполученню, є суміжними, і, у випадку секреторної лідерної послідовності, суміжними й у рамці зчитування. Проте, енхансери не повинні бути суміжними. Сполука завершується лігуванням у традиційних ділянках рестрикції. Якщо таких ділянок немає, то використовують синтетичні олігонуклеотидні адаптери або лінкери відповідно до традиційної практики.

50 Використовуваний у даному документі термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, одержуваного з сукупності практично однорідних антитіл, тобто формуючі популяцію окремі антитіла є ідентичними та/або зв'язуються з одним епітопом, за винятком можливих варіантних антитіл, наприклад природні мутації, що містять, або, що утворювалися в ході одержання препарату моноклональних антитіл, причому такі варіанти зазвичай присутні в незначних кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які, як правило, включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло з препарату моноклональних антитіл спрямоване проти однієї детермінанти на антигені. Таким чином, визначення "моноклональне" вказує на ознаку антитіла як одержуваного

з практично однорідної сукупності антитіл, і його не слід розглядати як потребує одержання яким-небудь конкретним способом антитіло. Наприклад, моноклональні антитіла, що підлягають застосуванню відповідно до даного винаходу, можуть бути отримані за допомогою ряду методик, включаючи без обмеження спосіб гібридом, способи з використанням рекомбінантної ДНК, способи фагового дисплея та способи з використанням трансгенних тварин, що містять всі імуноглобулінові локуси людини або їх частину, причому в даному документі описані такі способи й інші ілюстративні способи одержання моноклональних антитіл.

Термін "голе антитіло" відноситься до антитіла, яке не кон'юговане з гетерологічним фрагментом (наприклад, цитотоксичним фрагментом) або радіоактивною міткою. Голе антитіло може бути присутнім у фармацевтичному складі.

Термін "нативні антитіла" відноситься до молекул, що зустрічаються у природі, імуноглобуліну з різними структурами. Наприклад, нативні IgG-антитіла являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни масою приблизно 150000 дальтон, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, які зв'язані дисульфідними містками. Від N- до C-кінця кожний важкий ланцюг має варіабельну ділянку (VH), яку також називають варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, за яким ідуть три константні домени (CH1, CH2 і CH3). Аналогічно, від N- до C-кінця кожний легкий ланцюг має варіабельну ділянку (VL), яку також називають варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким іде константний домен (CL). Легкий ланцюг антитіла може бути віднесений до одного з двох типів, які називають каппа ( $\kappa$ ) і лямбда ( $\lambda$ ), на підставі амінокислотної послідовності її константного домена.

"Нативна послідовність Fc ділянки" містить амінокислотну послідовність, ідентичну амінокислотній послідовності Fc ділянки, яка зустрічається у природі. Людські Fc ділянки з нативною послідовністю включають без обмеження людську Fc ділянку IgG1 з нативною послідовністю (відмінну від A і A алотипи); людську Fc ділянку IgG2 з нативною послідовністю; людську Fc ділянку IgG3 з нативною послідовністю; і людську Fc ділянку IgG4 з нативною послідовністю, а також їх варіанти, що зустрічаються у природі.

"Варіантна Fc ділянка" містить амінокислотну послідовність, яка відрізняється від амінокислотної послідовності Fc ділянки з нативною послідовністю за рахунок щонайменше однієї амінокислотної модифікації, переважно однієї амінокислотної заміни або декількох амінокислотних заміни. Переважно, варіантна Fc ділянка має щонайменше одну амінокислотну заміну в порівнянні з Fc ділянкою з нативною послідовністю або Fc ділянкою вихідного поліпептиду, наприклад, від приблизно однієї до приблизно десяти амінокислотних заміни і переважно від приблизно однієї до приблизно п'яти амінокислотних заміни в Fc ділянці з нативною послідовністю або в Fc ділянці вихідного поліпептиду. Варіантна Fc ділянка в даному документі буде переважно мати щонайменше приблизно 80 % гомологію з Fc ділянкою з нативною послідовністю та/або з Fc ділянкою вихідного поліпептиду й найбільше переважно щонайменше приблизно 90 % гомологію з ними, більш переважно щонайменше приблизно 95 % гомологію з ними. Відповідно до деяких варіантів здійснення варіантна Fc ділянка не є глікозильованою.

Термін "запальний розлад кишечника", "запальне захворювання кишечника" або IBD застосовують у даному документі в найбільш широкому змісті, і він включає всі захворювання та патологічні стани, патогенез яких включає рецидивуюче запалення в кишечнику, включаючи тонкий кишечник і товсту кишку. Зазвичай спостережуване IBD включає виразковий коліт і хворобу Крона. IBD не обмежене UC і CD. Прояви захворювання включають без обмеження запалення та зниження цілісності епітелію в кишечнику.

Термін "серцево-судинне захворювання" або "серцево-судинне порушення" застосовують у даному документі в найбільш широкому змісті, і він включає всі захворювання та патологічні стани, патогенез яких включає патології кровоносних судин, такі як, наприклад, формування атеросклеротичних бляшок (включаючи стабільні або нестабільні/атероматозні бляшки), атеросклероз, артеріосклероз, артеріолосклероз і вплив підвищених ліпополісахаридів (LPS) у системному кровотоці. Термін додатково включає захворювання та патологічні стани, на які позитивно впливає інгібування формування атеросклеротичних бляшок. Серцево-судинні захворювання включають без обмеження атеросклероз коронарної артерії, коронарне мікросудинне захворювання, інсульт, захворювання сонної артерії, захворювання периферичних артерій, ішемію, хворобу коронарних артерій (CAD), гострий коронарний синдром (ACS), коронарне захворювання серця (CHD), стани, асоційовані з CAD і CHD, порушення мозкового кровообігу, захворювання периферичних судин, аневризми, васкуліт, венозний тромбоз, цукровий діабет і метаболічний синдром, хронічне захворювання нирок, глибоке ушкодження тканини після ішемії та реперфузії, серцево-легеневе шунтування.

Зокрема, у цю групу включають всі асоційовані серцево-судинні захворювання, частоту, розвиток або прогресування яких можна контролювати за допомогою інгібування формування атеросклеротичних бляшок.

Термін "серцево-судинний стан" застосовують у даному документі в найбільш широкому змісті, і він включає всі серцево-судинні стани та захворювання, патологію яких включає формування атеросклеротичних бляшок (включаючи стабільні або нестабільні/атероматозні бляшки), атеросклероз, артеріосклероз, артеріолосклероз і вплив підвищених ліпополісахаридів (LPS) у системному кровотоці. Зокрема, у цю групу включають всі серцево-судинні стани та захворювання, асоційовані з утворенням атеросклеротичних бляшок, частоту, розвиток або прогресування яких можна контролювати за допомогою інгібування формування атеросклеротичних бляшок. Термін, зокрема, включає захворювання та патологічні стани, на які позитивно впливає інгібування формування атеросклеротичних бляшок. Серцево-судинні стани включають без обмеження атеросклероз коронарної артерії, коронарне мікросудинне захворювання, інсульт, захворювання сонної артерії, захворювання периферичних артерій, ішемію, хворобу коронарних артерій (CAD), коронарне захворювання серця (CHD), стани, асоційовані з CAD і CHD, порушення мозкового кровообігу та стани, асоційовані з порушенням мозкового кровообігу, захворювання периферичних судин, аневризм, васкуліт, венозний тромбоз, цукровий діабет і метаболічний синдром, хронічне захворювання нирок, глибоке ушкодження тканини після ішемії та реперфузії й серцево-легеневе шунтування. Застосовуване в даному документі вираження "стани, асоційовані з порушенням мозкового кровообігу", включає, наприклад, транзиторну ішемічну атаку (ТІА) й інсульт. Застосовуване в даному документі вираження "стани, асоційовані з захворюванням периферичних судин", включає, наприклад, кульгавість. Зокрема, у цю групу включають всі асоційовані серцево-судинні захворювання та стани, частоту, розвиток або прогресування яких можна контролювати за допомогою інгібування формування атеросклеротичних бляшок.

Формування атеросклеротичних бляшок може відбуватися в результаті природної імунної реакції на метаболічний ендотоксикоз, який характеризується підвищеними рівнями ліпополісахаридів (LPS) у системному кровотоці, які беруть початок від кишкової мікробіоти, і втратою функціональної цілісності бар'єра слизової оболонки кишки. Уроджена імунна реакція на ендотоксикоз призводить у результаті до слабо вираженого хронічного запалення, яке призводить до формування бляшок.

Термін "метаболічний синдром" застосовують у даному документі в найбільш широкому змісті. Метаболічний синдром включає спільний прояв у дорослого суб'єкта декількох метаболічних факторів ризику, включаючи щонайменше три з наступних п'яти ознак: центральне ожиріння, яке може, наприклад, бути в окружності талії, що перевищує або дорівнює 90 см у чоловіків і перевищує або дорівнює 80 см у жінок; підвищений рівень тригліцеридів у сироватці крові, який може, наприклад, перевищувати або бути рівним 150 мг/дл, або лікування лікарським засобом від підвищених тригліцеридів; зменшений рівень HDL холестерину в сироватці крові, який може, наприклад, бути нижче 40 мг/дл у чоловіків і нижче 50 мг/дл у жінок, або лікування лікарським засобом для зниження HDL холестерину; гіпертонія, яка може, наприклад, являти собою систолічний тиск крові, що перевищує 130 мм рт.ст., і діастолічний тиск крові, що перевищує 85 мм рт.ст., або лікування лікарським засобом від гіпертонії; і підвищений рівень глюкози натще у плазмі, який може, наприклад, перевищувати або бути рівним 100 мг/дл, лікування лікарським засобом від підвищеного рівня глюкози, або раніше діагностований цукровий діабет 2 типу. Див. також Meigs, the Metabolic Syndrome (Insulin Resistance Syndrome or Syndrome X), <http://www.uptodate.com/contents/the-metabolic-syndrome-insulin-resistance-syndrome-or-syndrome-x> розкриття якого включено, таким чином, за допомогою посилання.

Для дітей старше 16 років можна застосовувати наведені вище критерії для дорослих. Для дітей віком 10-16 років метаболічний синдром включає спільний прояв у суб'єкта декількох метаболічних факторів ризику, включаючи щонайменше три з наступних п'яти ознак: центральне ожиріння, яке може, наприклад, бути в окружності більш 90-ої перцентилі; підвищений рівень тригліцеридів у сироватці, який може, наприклад, перевищувати або бути рівним 110 мг/дл, більше 95-ої перцентилі, або лікування лікарським засобом від підвищених тригліцеридів; зменшений рівень HDL холестерину в сироватці, який може, наприклад, бути нижче 40 мг/дл, менше 5-ої перцентилі, або лікування лікарським засобом для зниження HDL холестерину; гіпертонія, яка може, наприклад, являти собою систолічний тиск крові, що перевищує 130 мм рт.ст. і діастолічний тиск крові, що перевищує 85 мм рт.ст., більше 90-ої перцентилі, або лікування лікарським засобом від гіпертонії; і підвищений рівень глюкози натще у плазмі крові, який може, наприклад, перевищувати або бути рівним 100 мг/дл, порушення



толерантності до глюкози, лікування лікарським засобом від підвищеного рівня глюкози або раніше діагностований цукровий діабет 2 типу.

За великим рахунком, фактори ризику, які спільно проявляються при метаболічному синдромі, включають ожиріння (таке як центральне ожиріння), гіперглікемію, дисліпідемію, резистентність до інсуліну та/або гіпертонію. Всі ці фактори ризику стимулюють розвиток атеросклеротичного серцево-судинного захворювання, цукрового діабету або як першого, так і другого. Метаболічний синдром також може бути характерною ознакою хронічного запалення жирової тканини.

Метаболічний синдром можна розпізнати як прозапальний, претромботичний стан, і він може бути асоційований з підвищеними рівнями одного або декількох з С-реактивного білка, IL-6, LPS й інгібітора активатора плазміногена 1; такі маркери можуть бути асоційовані з підвищеним ризиком наступного розвитку атеросклеротичного серцево-судинного захворювання, цукрового діабету або як першого, так і другого.

Метаболічний синдром може бути асоційований з декількома пов'язаними з ожирінням захворюваннями, включаючи одне або декілька із захворювань жировою дистрофією з жировим гепатозом, фіброзом і цирозом, печінково-клітинної та внутрішньопечінкової холангіокарциноми, хронічного захворювання нирок, синдрому полікістозу яєчників, порушення подиху в сні, включаючи синдром обструктивного апное сну, і гіперурикемії та подагри.

Термін "пов'язане з інсуліном порушення" охоплює захворювання або стани, що характеризуються порушенням толерантності до глюкози. Відповідно до одного варіанта здійснення пов'язане з інсуліном порушення являє собою цукровий діабет, включаючи без обмеження цукровий діабет I типу (інсулін-залежний цукровий діабет або IDDM), II типу (інсулін-незалежний цукровий діабет або NIDDM), гестаційний діабет і будь-яке інше порушення, яке можна полегшити засобами, які стимулюють секрецію інсуліну. Відповідно до іншого варіанта здійснення пов'язане з інсуліном порушення характеризується резистентністю до інсуліну.

Термін "сепсис" застосовують в його найбільш широкому змісті, і він може охоплювати стан системного запалення, спровокований важкою інфекцією. Сепсис може викликати реакцію імунної системи на серйозну інфекцію, найчастіше бактеріальну, але також викликану грибами, вірусами та паразитами в крові, сечовивідних шляхах, легенях, шкірі або інших тканинах.

Термін "гострий ендотоксикоз" застосовують в його найбільш широкому змісті, і він може охоплювати стан підвищеного рівня бактеріального ліпополісахариду (LPS) у плазмі крові. У свою чергу, гострий ендотоксикоз може призвести до сепсису. Підвищений LPS у великому колі кровообігу буде індукувати хронічне слабе запалення, активуючи ендогенну захисну реакцію організму з підвищенням рівня ліпідів у плазмі крові, яке при хронічному стані сприяє розвитку індукованого раціоном ожиріння, резистентності до інсуліну й атеросклерозу та наступним випадкам CVD.

Застосовуваний у даному описі термін "лікування" (і його граматичні варіанти, такі як "лікувати" або "проведення лікування") відноситься до клінічного втручання в спробі змінити природний перебіг хвороби в індивідуума, що піддається лікуванню, і його можна здійснювати або для профілактики, або в ході протікання клінічної патології. Необхідні ефекти лікування включають без обмеження попередження прояву або рецидиву захворювання, ослаблення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, попередження метастазу, зниження швидкості прогресування захворювання, ослаблення або полегшення хворобливого стану та ремісію або поліпшений прогноз.

Наприклад, стосовно IBD, "лікування" може відноситися до зниження ймовірності розвитку IBD, зниження швидкості розвитку IBD і зниження тяжкості захворювання. В якості іншого прикладу, відносно формування атеросклеротичних бляшок, "лікування" може відноситися до зниження ймовірності розвитку відкладань атеросклеротичних бляшок, зниження швидкості розвитку відкладань, зниження кількості або розмірів існуючих відкладань або поліпшити стабільність бляшок. Потребує лікування включають суб'єктів, що вже мають захворювання, а також суб'єктів у яких необхідно попередити захворювання. Необхідні ефекти лікування включають без обмеження попередження прояву або рецидиву захворювання, ослаблення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, попередження захворювання, зниження швидкості прогресування захворювання, ослаблення, або полегшення, або ослаблення плинності захворювання та виклик ремісії або поліпшений прогноз. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом застосовують для затримки розвитку захворювання або вповільнення прогресування захворювання.

Відповідно до деяких варіантів здійснення "суб'єкт, що потребує цього" у контексті попередження або лікування серцево-судинного стану відноситься до суб'єкта, в якого

діагностували серцево-судинне захворювання, або серцево-судинний стан (CVD), або метаболічний синдром, або в якого спостерігають один або декілька станів, асоційованих із CVD або метаболічним синдромом, до суб'єкта, в якого діагностували або спостерігали один або декілька станів, асоційованих із CVD або метаболічним синдромом, у минулому, або до суб'єкта, який вважається підданим ризику розвитку CVD, або метаболічного синдрому, або одного або декількох станів, асоційованих із CVD або метаболічним синдромом, у майбутньому у зв'язку зі спадковістю або факторами навколишнього середовища. Таким чином, відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкт, що потребує цього, може бути суб'єктом, у якого спостерігають CVD, або метаболічний синдром, або стан, асоційований з CVD або метаболічним синдромом, або суб'єктом, у якого спостерігали CVD, або метаболічний синдром або стан, асоційований з CVD або метаболічним синдромом, у минулому, або вважається підданим ризику розвитку CVD, або метаболічного синдрому, або стану асоційованого з CVD або метаболічним синдромом, у майбутньому.

При лікуванні серцево-судинного захворювання або стану терапевтичний засіб безпосередньо змінювати ступінь реакції компонента імунної реакції або зробити захворювання більш чутливим до лікування іншими терапевтичними засобами, наприклад, антибіотиками, протигрибковими засобами, протизапальними засобами, хіміотерапевтичними засобами і тому подібним. При лікуванні артеріального захворювання лікування може, наприклад, попереджати або сповільнювати прогресування захворювання. Таким чином, лікування артеріального захворювання, зокрема, включає попередження, інгібування або вповільнення розвитку стану або прогресування від однієї стадії стану до іншої більш пізньої стадії або у більш важкий, зв'язаний стан.

"Патологія" захворювання або стану включає всі явища, які наражають на небезпеку здоров'я суб'єкта. У випадку серцево-судинного захворювання або стану вона включає без обмеження формування атеросклеротичних бляшок (включаючи стабільні/нестабільні/чутливі бляшки), атеросклероз, артеріосклероз, артеріолосклероз і вплив підвищених ліпополісахаридів (LPS) у системному кровотоці (LPS).

"Полегшення", "пом'якшення" або їх еквіваленти відносятся як до терапевтичного лікування, так і до профілактичних, і до превентивних заходів, при яких об'єкт повинен полегшити, попередити, сповільнити (зменшити), понизити або інгібувати захворювання або стан, наприклад, утворення атеросклеротичних бляшок. Потребуючі лікування включають суб'єктів, що вже мають захворювання або стан, а також суб'єктів, схильних до захворювання або стану, або суб'єктів, у яких необхідно попередити захворювання або стан.

"Постійне" введення відноється до введення засобу (засобів) у безперервному режимі, на противагу короткочасному режиму, так, щоб підтримувати первинний терапевтичний ефект протягом тривалого періоду часу.

"Періодичне" введення є лікуванням, яке здійснюють не послідовно без перерви, а скоріше циклічним способом.

Термін "листівка-вкладиш в упакуванні" використовують для позначення інструкцій, що традиційно включаються в комерційні впакування терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, комбіновану терапію, протипоказання та/або попередження відносно застосування таких терапевтичних продуктів.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" щодо еталонної поліпептидної послідовності визначають як відсоток амінокислотних залишків у кандидатній послідовності, які є ідентичними амінокислотним залишкам в еталонній поліпептидній послідовності після вирівнювання послідовностей і внесення гепів, якщо буде потреба, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовності, і не враховуючи будь-які консервативні заміни як частина ідентичності послідовності. Вирівнювання для визначення відсотка ідентичності амінокислотної послідовності можна здійснити різними способами, які стосуються компетенції фахівця в даній області, наприклад, за допомогою загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівець у даній області зможе визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для здійснення максимального вирівнювання за всією довжиною порівнюваних послідовностей. У контексті даного документа, проте, значення % ідентичності амінокислотної послідовності одержують за допомогою комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 була розроблена Genentech, Inc., і вихідний код був поданий з документацією для користувача у Відомство з охорони авторського права США, Washington D.C., 20559, при цьому він зареєстрований у Відомстві з охорони авторського права США під реєстраційним № TXU510087. Програма ALIGN-2 є

загальнодоступною від Genentech, Inc., Південний Сан Франциско, Каліфорнія, або може бути скопійована з вихідного коду. Програма ALIGN-2 може бути скопійована для застосування на операційній системі UNIX, включаючи Digital UNIX V4.0D. Усі параметри порівняння послідовностей установлюються за допомогою програми ALIGN-2 і не змінюються.

5 У випадках, коли ALIGN-2 використовують для порівнянь амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотної послідовності в заданій амінокислотній послідовності А до, з або щодо заданої амінокислотної послідовності В (що альтернативно можна перефразувати як задана амінокислотна послідовність А, яка має або характеризується певним % ідентичності амінокислотної послідовності до, з або щодо заданої амінокислотної послідовності В)

10 розраховують у такий спосіб:

100-кратне частне  $X/Y$

де Х являє собою число амінокислотних залишків, оцінених як ідентичні збіги програмою для вирівнювання послідовностей ALIGN-2, при такому вирівнюванні А і В за допомогою програми, і де Y являє собою сумарне число амінокислотних залишків у В. Слід розуміти, що якщо довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності В, то % ідентичності амінокислотної послідовності А до В не буде рівний % ідентичності амінокислотної послідовності В до А. Якщо спеціально не зазначено інше, всі значення % ідентичності амінокислотної послідовності, що використовуються в даному документі, отримані як описано у попередньому абзаці за допомогою комп'ютерної програми ALIGN-2.

20 В якості додаткових прикладів розрахунків % ідентичності амінокислотної послідовності за допомогою такого способу, нижче продемонстровано як розрахувати % ідентичності амінокислотної послідовності в амінокислотній послідовності, позначеній як "білок порівняння" або "еталонний білок", з амінокислотною послідовністю, позначеною як "IL-22", причому "IL-22" являє собою амінокислотну послідовність поліпептиду IL-22, що представляє інтерес, "білок для порівняння" являє собою амінокислотну послідовність поліпептиду щодо якого порівнюють поліпептид "IL-22", що представляє інтерес, а "X", "Y" і "Z" являють собою різні амінокислотні залишки.

В якості прикладів розрахунків % ідентичності амінокислотної послідовності за допомогою такого способу, у таблицях 1 і 2 продемонстровано як розрахувати % ідентичності амінокислотної послідовності в амінокислотній послідовності, позначеній "білок порівняння", з амінокислотною послідовністю, позначеною "IL-22", причому "IL-22" являє собою амінокислотну послідовність поліпептиду IL-22, що представляє інтерес, "білок порівняння" являє собою амінокислотну послідовність поліпептиду щодо якого порівнюють поліпептид "IL-22", що представляє інтерес, і "X", "Y" і "Z" являють собою різні амінокислотні залишки.

35

IL-22	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Довжина = 15 амінокислот)
Еталонний білок	XXXXXXXXYYYYYY	(Довжина = 12 амінокислот)

% амінокислотної ідентичності =  
(кількість ідентично співпадаючих амінокислотних залишків між двома поліпептидними послідовностями)  
Ділена на (загальну кількість амінокислотних залишків поліпептиду IL-22)=  
5 ділене на 15=33,3 %

IL-22	XXXXXXXXXX	(Довжина = 10 амінокислот)
Еталонний білок	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(Довжина = 15 амінокислот)

% амінокислотної ідентичності =  
(кількість ідентично співпадаючих амінокислотних залишків між двома поліпептидними послідовностями)  
Ділена на (загальну кількість амінокислотних залишків поліпептиду IL-22)=  
5 ділене на 10=50,0 %

"Твердість" реакцій гібридизації зможе легко визначити рядовий фахівець у даній області, і, як правило, вона є результатом емпіричного розрахунку залежно від довжини зонда, температури промивання та концентрації солі. У більшості випадків, більш довгі зонди

40 потребують більш високих температур для правильної гібридизації, у той час як більш короткі зонди потребують більш низьких температур. Гібридизація, як правило, залежить від здатності денатурованої ДНК назад гібридизуватися, якщо в навколишньому середовищі з температурою, яка нижче їх температури плавлення, присутні комплементарні нитки. Чим вище ступінь необхідної гомології між зондом і гібридизованою послідовністю, тим вище відносна температура, яку можна використовувати. У результаті з цього випливає, що більш високі

45 відносні температури, як правило, будуть робити реакційні умови більш жорсткими, у той час як

більш низькі температури будуть робити їх менш жорсткими. Для додаткових подробиць та пояснення твердості реакцій гібридизації, див. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Жорсткі умови" або "умови високої жорсткості", які визначені в даному документі, можна встановити за допомогою наступних: (1) використовувати низьку іонну силу та високу температуру для промивання, наприклад, 0,015 М натрію хлориду/0,0015 М натрію цитрату/0,1 % натрію додецилсульфату при 5 °C; (2) використовувати протягом гібридизації денатуруючий засіб, таке як формамід, наприклад, 50 % (об'єм/об'єм) формаміду з 0,1 % бичачого сироваткового альбуміну/0,1 % фіколу/0,1 % полівінілпіролідону/50 мМ натрій-фосфатного буфера при pH 6,5 з 750 мМ натрію хлориду, 75 мМ натрію цитрату при 42 °C; або (3) гібридизувати протягом ночі в розчині, в якому використано 50 % формаміду, 5 x SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М натрію цитрату), 50 мМ фосфату натрію (pH 6,8), 0,1 % натрію пірофосфату, 5 x розчин Денхардта, піддана ультразвуковий обробці ДНК із молок лососевих (50 мкг/мл), 0,1 % SDS і 10 % сульфату декстрану при 42 °C, з 10 хвилинним промиванням при 42 °C в 0,2 x SSC (натрію хлориду/натрію цитрату), з наступним 10-хвилинним промиванням в умовах високої жорсткості, що полягають в 0,1 x SSC, що містить EDTA, при 55 °C.

"Помірно жорсткі стани" можна встановити як описано в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, і включають застосування промиваючого розчину, і умови гібридизації (наприклад, температуру, іонну силу та % SDS), менш жорсткі, ніж описані вище. Прикладом помірно жорстких умов є культивування протягом ночі при 37 °C у розчині, що містить: 20 % формаміду, 5 x SSC (150 мМ NaCl, 15 мМ тринатрію цитрату), 50 мМ натрію фосфату (pH 7,6), 5 x розчин Денхардта, 10 % сульфату декстрану й 20 мкг/мл денатурованої дегідратованої у результаті гідродинамічного зрушення ДНК із молок лососевих, з наступним промиванням фільтрів в 1 x SSC при приблизно 37-50 °C. Фахівець у даній області зрозуміє як скорегувати температуру, іонну силу тощо, якщо буде потреба, щоб привести у відповідність з такими факторами, як довжина зонда тощо.

Термін "агоніст" застосовують у найбільш широкому змісті, і він включає будь-яку молекулу, яка частково або повністю імітує біологічну активність поліпептиду IL-22. Також "агоністом" охоплюються молекули, які стимулюють транскрипцію або трансляцію іРНК, що кодує поліпептид.

Підходящі молекули агоніста включають, наприклад, агоністичні антитіла або фрагменти антитіл; нативний поліпептид; фрагменти або варіанти амінокислотної послідовності нативного поліпептиду; пептиди; антизначенніві олігонуклеотиди; малі органічні молекули; і нуклеїнові кислоти, які кодують поліпептиди, агоністи або антитіла. Вказівка агоніста у формі однини охоплює один агоніст або комбінацію з двох або більш різних агоністів.

Термін "агоніст IL-22" застосовують у найбільш широкому змісті, і він включає будь-яку молекулу, яка імітує якісну біологічну активність (визначення якої дано в даному документі вище) поліпептиду IL-22 з нативною послідовністю. Агоністи IL-22, зокрема, включають поліпептиди IL-22-Fc або IL-22 Ig (імуноадгезини), а також малі молекули, що імітують щонайменше одну біологічну активність IL-22. Переважно, біологічна активність полягає у зв'язуванні рецептора IL-22, взаємодії з IL-22BP, полегшенні проходження природної імунної реакції або, у випадку серцево-судинного захворювання або стану, у впливі на формування атеросклеротичних бляшок, зокрема, в інгібуванні формування атеросклеротичних бляшок. Інгібування формування бляшок можна оцінити будь-яким підходящим способом візуалізації, відомим фахівцю в даній області.

IL-22R1 утворює пари з іншими білками з формуванням гетеродимерів як рецептори для деяких представників сімейства IL-10. Див. Quyang et al., 2011, раніше. Таким чином, відповідно до деяких варіантів здійснення агоністи IL-22 можуть включати агоніст рецептора IL-22, у тому числі цитокін (або химерний білок або його агоніст), який зв'язується та запускає проведення сигналу від IL-22 R1. Відповідно до деяких варіантів здійснення агоністи IL-22 включають агоніст IL-22R1, у тому числі без обмеження агоністичне антитіло до IL-22R1; агоніст IL-20, у тому числі без обмеження поліпептид IL-20 або химерний білок IL-20 Fc; і агоніст IL-24, у тому числі без обмеження поліпептид IL-24 або химерний білок IL-24. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення агоністи IL-22R1 включають агоніст IL-19, у тому числі без обмеження поліпептид IL-19 або химерний білок IL-19 Fc; і агоніст IL-26, у тому числі без обмеження поліпептид IL-26 або химерний білок IL-26 Fc. Ілюстративні послідовності для IL-19 (номер доступу Genbank AAG16755.1, SEQ ID NO:77), IL-20 (номер доступу Genbank AAN69311.1, SEQ ID NO:78), IL-24 (номер доступу Genbank AAN09681.1, SEQ ID NO:79) і IL-26 (номер доступу Genbank NP\_060872.1, SEQ ID NO:80) наведені в даному документі. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-19 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:77 або зрілий білок

без сигнального пептиду. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення поліпептид IL-20 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:78 або зрілий білок без сигнального пептиду. Відповідно до ще одних варіантів здійснення поліпептид IL-24 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79 або зрілий білок без сигнального пептиду. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення поліпептид IL-26 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:80 або зрілий білок без сигнального пептиду.

"Малу молекулу" визначають у даному документі як таку, що має молекулярну масу нижче приблизно 600, переважно нижче приблизно 1000 дальтон.

У контексті даного винаходу "агоністичне антитіло" є антитілом, яке частково або повністю імітує біологічну активність поліпептиду IL-22.

Термін "фармацевтичний склад" або "фармацевтична композиція" відноситься до препарату, який має таку форму, що забезпечує ефективну біологічну активність описаного в даному документі активного інгредієнта й яка не містить додаткових компонентів, що є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому буде введений склад.

"Фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнта у фармацевтичному складі, відмінному від активного інгредієнта, який є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає без обмеження буфер, допоміжний засіб, розріджувач, стабілізуючий засіб або консервант.

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" відноситься до домена важкого або легкого ланцюга антитіла, який залучений у зв'язування антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга та легкого ланцюга (VH і VL, відповідно) нативного антитіла зазвичай мають подібні структури, причому кожний домен містить чотири консервативні каркасні ділянки (FR) і три гіперваріабельні ділянки (HVR). (Див., наприклад, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Одного домена VH або VL може бути досить для надання антигенсполучної специфічності. Крім того антитіла, що зв'язуються з конкретним антигеном, можуть бути виділені за допомогою домена VH або VL з антитіла, що зв'язується з антигеном, для скринінгу бібліотеки, відповідно, комплементарних доменів VL або VH. Див., наприклад, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Використовуваний у даному документі термін "вектор" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної розмножити іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. Термін включає вектор як самореплікуючу структуру нуклеїнової кислоти, а також вектор, вбудований у геном клітини-хазяїна, в яку він був уведений. Деякі вектори здатні керувати експресією нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори в даному документі називають "векторами експресії".

## II. Композиції та способи

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься, почасти, до композиції, що містить терапевтичні засоби, які полегшують асоційовані з IL-22 захворювання або порушення за допомогою підвищення активностей або проведення сигналу IL-22. Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до поліпептиду IL-22 і химерних білків IL-22 Fc, які зв'язуються й активують рецептор IL-22. Химерні білки IL-22 Fc за даним винаходом придатні, наприклад, для діагностики або лікування асоційованих із IL-22 захворювань, таких як запальне захворювання кишечника, і прискорення загоєння ран. Крім того, даний винахід відноситься до поліпептиду IL-22 і химерних білків IL-22 Fc для лікування інших асоційованих із IL-22 захворювань, наприклад, серцево-судинних станів, метаболічного синдрому, і прискорення загоєння діабетичних ран.

### A. Ілюстративний поліпептид IL-22

У контексті даного винаходу поліпептид IL-22 включає поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, що містить SEQ ID NO:71 (людський IL-22 з ендегенною лідерною послідовністю IL-22) (див. фігуру 31), або поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, що має послідовність, щонайменше на 95 % ідентичну SEQ ID NO:71. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22 містить амінокислотну послідовність, що містить SEQ ID NO:4 (людський IL-22 без лідерної послідовності), або поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, що щонайменше на 95 % ідентична. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22 містить амінокислотну послідовність, що містить SEQ ID NO:4. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22 не містить химеру Fc.

Одержання нативних молекул IL-22, поряд із їхніми послідовностями нуклеїнової кислоти та поліпептидними послідовностями, можна здійснити за допомогою способів, відомих рядовим фахівцям у даній області. Наприклад, поліпептиди IL-22 можна одержати за допомогою культивування клітин, трансформованих або трансфікованих за допомогою вектора, що містить

нуклеїнову кислоту IL-22. Зазвичай, мають на увазі, що для одержання IL-22 можна використовувати альтернативні способи, які добре відомі з рівня техніки. Наприклад, послідовність IL-22 або її частину, можна одержати шляхом безпосереднього синтезу пептидів із застосуванням твердофазних методик (див., наприклад, роботи 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 білків можна проводити із застосуванням ручних методик або шляхом автоматизації. Автоматизований синтез можна здійснити, наприклад, за допомогою синтезатора пептидів Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Фостер Сіті, Каліфорнія) згідно з інструкціями виробника. Пізні частини IL-22 можна окремо синтезувати хімічними способами й об'єднати за допомогою хімічних або ферментативних способів з одержанням повнорозмірного IL-22.

Варіанти IL-22 можна одержати за допомогою внесення відповідних нуклеотидних змін у ДНК, що кодує поліпептид IL-22 з нативною послідовністю, або за допомогою синтезу необхідного поліпептиду IL-22. Фахівець у даній області зрозуміє, що амінокислотні зміни можуть змінити посттрансляційні процеси IL-22, наприклад, зміна числа або положення сайтів глікозилювання або зміна характеристик закорювання в мембрані.

Можна одержати варіанти описаних у даному документі поліпептидів IL-22 з нативною послідовністю, наприклад, за допомогою будь-яких методик і керівництв з консервативних і неконсервативних мутацій, викладених, наприклад, у патенті США №5364934. Зміни можуть являти собою заміну, делецію або вставку одного або декількох кодонів, що кодують нативну послідовність або варіант IL-22, що призводить у результаті до зміни його амінокислотної послідовності у порівнянні з відповідною нативною послідовністю або варіантом IL-22. Необов'язково варіацію здійснюють за допомогою заміни щонайменше однієї амінокислоти іншою амінокислотою в одному або декількох доменах поліпептиду IL-22 з нативною послідовністю. Керівництво до визначення того, який амінокислотний залишок можна вставити, замінити або вилучити без негативного впливу на необхідну активність, можна знайти в результаті порівняння послідовності IL-22 з послідовністю з гомологічних відомих білкових молекул і мінімізації числа змін в амінокислотній послідовності, виконаних у ділянках з високою гомологією. Амінокислотні заміни можуть бути результатом заміни однієї амінокислоти на іншу амінокислоту, що має схожі структурні та/або хімічні властивості, наприклад, заміна лейцину на серин, тобто консервативні амінокислотні заміни. Вставки або делеції необов'язково можуть перебувати в діапазоні від 1 до 5 амінокислот. Можливі зміни можна визначити за допомогою систематичного здійснення вставок, делецій або замін амінокислот у послідовності та перевірки отриманих у результаті варіантів на активність в аналізі in vitro, описаному в наведених нижче прикладах.

Відповідно до конкретних варіантів здійснення консервативні заміни, що представляють інтерес, показані в таблиці 1 під заголовком "Переважаючі заміни". Якщо такі заміни призводять у результаті до зміни біологічної активності, то вносять більш значимі зміни, позначені ілюстративними замінами в таблиці 1 або більш детально описані нижче відносно амінокислотних класів, і піддають продукти скринінгу.

Зміни можна здійснити за допомогою способів, відомих з рівня техніки, таких як олігонуклеотид-опосередкований (сайт-спрямований) мутагенез, аланінове сканування та ПЛР-мутагенез. Сайт-спрямований мутагенез (Carter et al., 1986, Nucl. Acids Res, 13:4331; Zoller et al., 1987, Nucl. Acids Res., 10:6487), касетний мутагенез (Wells et al., 1985, Gene, 34:315), мутагенез із рестрикційним відбором (Wells et al., 1986, Philos. Trans. R. Soc. London Sera, 317:415) або інші відомі методики можна здійснювати на клонованій ДНК із одержання варіантної ДНК IL-22.

Також у даному документі наведені фрагменти поліпептиду IL-22 за даним винаходом. Такі фрагменти можуть бути вкорочені на N-кінці або C-кінці, або вони можуть бути позбавлені внутрішніх залишків, наприклад, при порівнянні з повнорозмірним нативним білком. У деяких фрагментів відсутні амінокислотні залишки, які не є ключовими для необхідної біологічної активності поліпептиду IL-22 за даним винаходом. Отже, відповідно до деяких варіантів здійснення фрагмент поліпептиду IL-22 є біологічно активним. Відповідно до деяких варіантів здійснення у повнорозмірного фрагмента IL-22 відсутня N-кінцева сигнальна пептидна послідовність.

В об'єм даного винаходу включені ковалентні модифікації нативної послідовності та варіантних поліпептидів IL-22. Один тип ковалентної модифікації включає цільові вступу в реакцію амінокислотних залишків IL-22 з органічним дериватизуючим засобом, який може вступати в реакцію з вибраними бічними ланцюгами або N- або C-кінцевими залишками поліпептиду IL-22. Дериватизація за допомогою біфункціональних засобів придатна, наприклад, для зшивання IL-22 з нерозчинною у воді матрицею-основною або поверхнею основи, наприклад,

для застосування в способі очищення антитіл до IL-22. Широко застосовувані зшиваючі засоби включають, наприклад, 1,1-біс(діазо-ацетил)-2-фенілетан, глутаральдегід, N-гідроксисукцинімідні складні ефіри, наприклад, складні ефіри з 4-азидосаліциловою кислотою, гомобіфункціональні складні імідоєфіри, включаючи дисукцинімідилові складні ефіри, такі як 3,3'-дитіобіс(сукцинімідил-пропіонат), біфункціональні малеїміди, такі як біс-N-малеїмідо-1,8-октан, і такі засоби, як метил-3-[(p-азидофеніл)дитіо]пропіонімідат.

Інші модифікації включають дезамідування глютамінілових і аспарагінілових залишків до відповідних глютамілових і аспартилових залишків, відповідно, гідроксилювання проліну й лізину, фосфорилювання гідроксильних груп серилових або треонілових залишків, метилування альфа-аміногруп бічних ланцюгів лізину, аргініну й гістидину (T. E. Creighton, 1983, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86i), ацетилювання N-кінцевого аміну й амідування будь-якої C-кінцевої карбоксильної групи.

Інший тип ковалентної модифікації поліпептидів IL-22, включених в об'єм даного винаходу, включає зміну нативного паттерна глікозилювання поліпептидів. "Зміна нативного паттерна глікозилювання" мають на увазі, у контексті даного винаходу, як таке, що означає видалення одного або декількох вуглеводних фрагментів, що зустрічаються в нативній послідовності IL-22, і/або додавання одного або декількох сайтів глікозилювання, які відсутні в нативній послідовності IL-22, і/або зміну співвідношення та/або складу залишків цукрів, приєднаних до сайту (сайтів) глікозилювання.

Глікозилювання поліпептидів є зазвичай або N-зчепленим, або O-зчепленим. N-зчеплене глікозилювання відноситься до приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга аспарагінового залишку. Трипептидні послідовності, аспарагін-X-серин і аспарагін-X-треонін, причому X є будь-якою амінокислотою за винятком проліну, є розпізнавальними послідовностями для ферментативного прикріплення вуглецевого фрагмента до аспарагінового бічного ланцюга. O-зчеплене глікозилювання відноситься до прикріплення одного з цукрів N-ацетилгалактозаміну, галактози або ксилози до гідроксіамінокислоти, найчастіше серину або треоніну, хоча в O-зчеплене глікозилювання може бути також залучений 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін. Додавання сайтів глікозилювання у поліпептид IL-22 можна здійснити шляхом зміни амінокислотної послідовності. Зміну можна виконати, наприклад, за допомогою додавання одного або декількох серинових або треонінових залишків, або заміни на них, у нативній послідовності IL-22 (для сайтів N-зчепленого глікозилювання) або додавання послідовності розпізнавання для O-зчепленого глікозилювання. Амінокислотну послідовність IL-22 необов'язково можна змінити за допомогою змін рівня ДНК, зокрема, за допомогою мутування ДНК, що кодує поліпептид IL-22, за попередньо вибраними підставами так, щоб одержати кодони, які будуть транслюватися в необхідні амінокислоти.

Інші способи збільшення числа вуглеводних фрагментів на поліпептиді IL-22 полягають у хімічному або ферментативному зв'язуванні глікозидів з поліпептидом. Такі способи описані в даній області, наприклад, у WO 87/05330, опублікованій 11 вересня 1987 року, і в роботі Arlin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Видалення вуглеводних фрагментів, що присутні на поліпептиді IL-22, можна здійснити хімічно або ферментативно або за допомогою мутаційної заміни кодонів, що кодують амінокислотні залишки, які служать в якості цілей для глікозилювання. Методи хімічного деглікозилювання відомі в даній області й описані, наприклад, в роботі Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) і в роботі Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Ферментативне розщеплення вуглеводних фрагментів на поліпептидах можна здійснити за допомогою ряду ендо- й екzogлікозидаз, які описані в роботі Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Інший тип ковалентної модифікації IL-22 включає зв'язування поліпептиду IL-22 з одним або множиною небілкових полімерів, наприклад, поліетиленгліколем, поліпропіленгліколем або поліоксіалкіленами, наприклад, так, як викладено у патентах США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 або 4179337. Нативну послідовність та варіантний IL-22 також можна модифікувати таким чином, щоб одержати химерну молекулу, що являє собою IL-22, у тому числі фрагменти IL-22, гібридизовані з іншим гетерологічним поліпептидом або іншою гетерологічною амінокислотою послідовністю.

Відповідно до одного варіанта здійснення така химерна молекула являє собою химеру IL-22 з поліпептидом-міткою, який створює епітоп, з яким може селективно зв'язуватися антитіло до мітки. Епітопна мітка, як правило, розташована на аміно- або карбокси-кінці поліпептиду IL-22. Наявність таких форм із епітопною міткою поліпептиду IL-22 можна визначити за допомогою антитіла до поліпептиду-мітки. Також, розміщення епітопної мітки дає можливість легкого очищення поліпептиду IL-22 за допомогою афінного очищення із застосуванням антитіла до

мітки або іншого типу афінної матриці, яка зв'язується з епітопною міткою. У даній області добре відомі різні поліпептиди-мітки та відповідні їм антитіла. Приклади включають полігістидинові (полі-his) або полі-гістидин-гліцинові (полі-his-gly) мітки; поліпептид-мітка, що представляє собою НА вірусу грипу, і його антитіло 12CA5 (Field et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165); с-мус мітку й антитіло 8F9, 3C7, 6E10, G4 і 9E10 до неї (Evan et al., 1985, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616); і мітку, що представляє собою глікопротеїн D (gD) вірусу простого герпеса, і її антитіло (Paborsky et al., 1990, Protein Engineering, 3(6):547-553). Інші поліпептиди-мітки включають Flag-пептид (Hopp et al., 1988, Biotechnology, 6:1204-1210); пептид з епітопом KT3 (Martin et al., 1992, Science, 255:192-194); пептид з бета-тубуліновим епітопом (Skinner et al., 1991, J. Biol. Chem., 266:15163-15166); і пептидну мітку на основі білка гена 10 T7 (Lutz-Freyermuth et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397).

Відповідно до іншого варіанта здійснення химерна молекула може являти собою химеру з поліпептиду IL-22 або його фрагмента з імуноглобуліном або конкретною ділянкою імуноглобуліну. Що стосується бівалентної форми химерної молекули, то така химера може бути утворена з Fc ділянкою молекули IgG. Такі химерні поліпептиди є антитіло-подібними молекулами, які поєднують сполучну специфічність гетерологічного білка ("адгезину") з ефекторними функціями імуноглобулінових константних доменів, і часто називаються імуноадгезинами. Структурно імуноадгезини являють собою химеру амінокислотної послідовності IL-22 або її варіанта та послідовності імуноглобулінового константного домена. Адгезинова частина імуноадгезинової молекули, як правило, являє собою безперервну амінокислотну послідовність, що містить щонайменше сайт зв'язування рецептора або ліганду. Послідовність константного домена імуноглобуліну в імуноадгезині можна одержати з будь-якого імуноглобуліну, такого як підтипи IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4, IgA (включаючи IgA1 і IgA2), IgE, IgD або IgM. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc характеризується модифікованою ефекторною активністю.

Поліпептид IL-22, або його фрагмент, можна гібридизувати, наприклад, з послідовністю константної ділянки імуноглобулінового важкого ланцюга з одержанням химерного білка IL-22-Ig (наприклад, химерного білка IL-22 Fc). Поліпептид IL-22 може являти собою людський або мишачий IL-22. Послідовність константної ділянки імуноглобулінового важкого ланцюга може являти собою людську або мишачу послідовність константної ділянки імуноглобулінового важкого ланцюга.

#### В. Ілюстративний химерний білок IL-22 Fc

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до виділеного химерного білка IL-22. Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 зв'язується з рецептором IL-22 й індукує його активність або проведення сигналу від нього й/або є агоністом активності IL-22 рецептора.

Відповідно до іншого аспекту химерний білок IL-22 Fc містить поліпептид, який має послідовність, щонайменше на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO:4. Відповідно до іншого варіанта здійснення химерний білок IL-22 Fc містить поліпептид, який має послідовність, щонайменше на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичну послідовності, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції щодо еталонної послідовності, але при цьому химерний білок IL-22 Fc, що містить таку послідовність, зберігає здатність зв'язуватися з IL-22 рецептором. Відповідно до деяких варіантів здійснення сумарно від 1 до 10 амінокислот були замінені, вставлені та/або вилучені в SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 24 або 26. Відповідно до деяких варіантів здійснення заміни, вставки або делеції перебувають у ділянках поза IL22 (тобто в Fc). Відповідно до деяких конкретних варіантів здійснення вилучений залишок Lys на С-кінці Fc. Відповідно до деяких інших варіантів здійснення вилучені залишки як Gly, так і Lys на С-кінці Fc.

Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до варіантів химерних білків IL-22 Fc, що мають одну або декілька амінокислотних заміни. Консервативні заміни показані в таблиці 1 під заголовком "Переважаючі заміни". Більш значимі зміни наведені в таблиці 1 під заголовком "Ілюстративні заміни" і додатково описані нижче відносно класів бічних ланцюгів амінокислот. Амінокислотні заміни можуть бути внесені в химерний білок IL-22 Fc, а продукти піддані скринінгу відносно необхідної активності, наприклад, збереженого/поліпшеного зв'язування рецептора IL-22, зниженої імуногенності або поліпшеного проведення сигналу від рецептора IL-22.



Таблиця 1

Вихідний залишок	Ілюстративні заміни	Переважні заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 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

Амінокислоти можуть бути згруповані відповідно до загальних властивостей бічних ланцюгів:

- (1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислі: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни спричиняють обмін члена одного з таких класів на члена іншого класу.

Придатний спосіб ідентифікації залишків або ділянок білка, які можуть служити об'єктом для мутагенезу, називається "скануючий аланіном мутагенез", описуваний у роботі Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Цей спосіб включає виявлення та заміну залишку або групи цільових залишків (наприклад, заряджених залишків, таких як arg, asp, his, lys і glu) на нейтральну або негативно заряджену амінокислоту (наприклад, аланін або поліаланін) для визначення того, чи зачіпається взаємодія білка з його партнером із зв'язування. В амінокислотні положення можуть бути введені додаткові заміни, що демонструють функціональну чутливість до первісних замін. Альтернативно, або додатково, кристалічну структуру білкового комплексу (наприклад, комплексу цитокін-рецептор) можна використовувати для визначення точок контакту між білком і його партнером із зв'язування. Такі контактуючі залишки та сусідні залишки можуть бути вибрані або виключені в якості кандидатів на заміну. Варіанти можуть бути піддані скринінгу для визначення того, чи мають вони необхідні властивості.

Вставки в амінокислотних послідовностях включають гібридизації з аміно- і/або карбоксильним кінцем, що варіюють за довжиною від одного залишку до поліпептидів, що містять сотні або більше залишків, а також вставки всередині послідовності з одного або множини амінокислотних залишків.

а) Варіанти з глікозилюванням

Відповідно до деяких варіантів здійснення наведений у даному документі химерний білок Fc змінюють з метою збільшення або зменшення ступеня, до якого глікозилюється химерний білок, особливо Fc частина химерного білка. Додавання або видалення ділянок глікозилювання у білка можна легко здійснити шляхом зміни амінокислотної послідовності так, щоб створити або вилучити один або декілька сайтів глікозилювання.

Якщо химерний білок містить Fc ділянку, то може бути змінений приєднаний до нього

вуглевод. Вироблювані клітинами ссавця нативні антитіла, як правило, містять розгалужений, двуантенарний олігосахарид, який зазвичай приєднаний за допомогою N-зв'язку до Asn297 домена CH2a в Fc ділянці. Див., наприклад, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Олігосахарид може включати різні вуглеводи, наприклад, маннозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc в "стовбурі" двуантенарної олігосахаридної структури. Відповідно до деяких варіантів здійснення для створення Fc варіантів з певними поліпшеними властивостями в антитілі або Fc ділянці можуть бути виконані модифікації олігосахариду.

Можна визначити кількість фукози, прикріпленої до домена CH2 Fc ділянки, шляхом розрахунків середньої кількості фукози в цукровому ланцюзі в Asn297 стосовно суми всіх приєднаних до Asn297 або N297 глікоструктур (наприклад, складних, гібридних структур і структур з високим вмістом маннози) за результатами вимірювання MALDI-TO мас-спектрометрії, як, наприклад, описано у WO 2008/077546. Asn297 відноситься до аспарагінового залишку, розташованого приблизно в 297 положенні Fc ділянки (нумерація залишків Fc ділянки за EU); проте, Asn297 також може бути розташований приблизно  $\pm 3$  амінокислоти вище або нижче 297 положення, тобто між положеннями 294 і 300, через незначні варіації послідовностей в антитіл. Такі варіанти антитіл можуть характеризуватися поліпшеною ADCC функцією. Див., наприклад, патентні публікації США № US 2003/0157108 (Presta, L.), US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Приклади публікацій, що відносяться до "дефукозилізованих" варіантів антитіл або варіантів антитіл "з дефіцитом за фукозою", включають: 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). Приклади здатних продукувати дефукозилізовані антитіла клітинних ліній включають клітини CHO Lec13, дефектні за фукозилуванням білка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); патентна заявка № US 2003/0157108, Presta, L.; і WO 2004/056312 A1, Adams et al., особливо в прикладі 11), і нокаутні клітинні лінії, такі як клітини CHO з нокаутним геном альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8 (див., наприклад, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); і WO2003/085107).

Варіанти антитіл додатково забезпечують розділеними навіпіл олігосахаридами, наприклад, у яких приєднаний до Fc ділянки антитіла двуантенарний олігосахарид розділений навіпіл за допомогою GlcNAc. Такі варіанти антитіла можуть характеризуватися зниженим фукозилуванням і/або поліпшеною ADCC функцією. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, у WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.), патенті США № 6602684 (Umana et al.) і US 2005/0123546 (Umana et al.). Також даний винахід відноситься до варіантів антитіл щонайменше з одним залишком галактози у приєднаному до Fc ділянки олігосахариді. Такі варіанти антитіл можуть характеризуватися поліпшеною CDC функцією. Такі варіанти антитіл описані, наприклад, у WO 1997/30087 (Patel et al.), WO 1998/58964 (Raju, S.) і WO 1999/22764 (Raju, S.).

#### b) Варіанти Fc ділянки

Відповідно до певних варіантів здійснення в Fc ділянку наведеного в даному документі химерного білка Fc можуть бути введені одна або декілька амінокислотних модифікацій з одержанням, таким чином, варіанта Fc ділянки. Варіант Fc ділянки може містити послідовність Fc ділянки людини (наприклад, Fc ділянка IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини) амінокислотну модифікацію, що містить (наприклад, заміну) в одному або декількох амінокислотних положеннях.

Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до варіанта Fc, який має деякі, але не всі, ефекторні функції, що робить його бажаним кандидатом для застосувань, в яких важливий період напівжиття антитіла або химерного білка, що містить Fc ділянку, *in vivo*, але визначені ефекторні функції (наприклад, комплементу й ADCC) не є необхідними або є пагубними. Для підтвердження зниження/ зменшення CDC і/або ADCC активностей можуть бути проведені аналізи цитотоксичності *in vitro* і/або *in vivo*. Наприклад, аналізи зв'язування з рецептором Fc (FcR) можуть бути проведені для того, щоб переконатися, що антитіло або Fc не може зв'язуватися з FcγR (отже, імовірно не має ADCC активність), але зберігає здатність зв'язуватися з FcRn. Первинні клітини для опосередкування ADCC, NK-клітини, експресують тільки FcγRIII, у той час як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресія FcR на гематопоетичних клітинах узагальнена в таблиці 3 на сторінці 464 у роботі Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Необмежуючі приклади аналізів *in vitro* для оцінки ADCC активності молекули, що представляє інтерес, описані у патенті США №US 5500362 (див., наприклад, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) і Hellstrom, I et al.,

Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5821337 (див. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно, можуть бути задіяні способи нерадіоактивних аналізів (див., наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності АСТІ™ для проточної цитометрії (Celltechnology, Inc., Маунтин-В'ю, Каліфорнія) і нерадіоактивний аналіз цитотоксичності Cytotox 96® (Promega, Медісон, Вісконсін). Придатні ефекторні клітини для таких аналізів включають моноклеарні периферичної крові (РВМС) і натуральні клітини-кілери (NK). Альтернативно, або додатково, ADCC активність молекули, що представляє інтерес, може бути оцінена *in vivo*, наприклад, на тваринній моделі, як, наприклад, розкрито в роботі Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Також можуть бути здійснені аналізи зв'язування C1q для підтвердження того, що антитіло або Fc не здатне зв'язуватися з C1q і, отже, не має CDC активність. Див., наприклад, результати ELISA із зв'язування з C1q і C3c у WO 2006/029879 і WO 2005/100402. Для оцінки активації комплементу може бути проведений аналіз CDC (див., наприклад, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); і Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Визначення зв'язування FcRn і виведення/період напівжиття *in vivo* можуть бути здійснені за допомогою відомих у даній області техніки способів (див., наприклад, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла із заміною одного або декількох залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 в Fc ділянці (див., наприклад, патент США № 6737056). Такі Fc-мутанти включають Fc-мутантів із замінами за двома або більше амінокислотними положеннями 265, 269, 270, 297 і 327, у тому числі так званий Fc-мутант "DANA" із заміною залишків 265 і 297 на аланін (патент США № 7332581).

Описані деякі варіанти антитіл або Fc з підвищеним або зниженим зв'язуванням з FcR. (Див., наприклад, патент США № 6737056 WO 2004/056312 і роботи Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).)

Відповідно до деяких варіантів здійснення химерний білок IL-22 Fc містить варіант Fc з однією або декількома амінокислотними замінами, які зменшують ADCC, наприклад, заміну в положенні 297 Fc ділянки для видалення сайту N-глікозилування, і все ще зберігає активність зв'язування FcRn (нумерація залишків за EU).

Відповідно до деяких варіантів здійснення в Fc ділянці здійснюють зміни, які в результаті дають знижене зв'язування C1q і/або змінену комплементозалежну цитотоксичність (CDC), наприклад, як описано у патенті США № 6194551, WO 99/51642 і роботі Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Антитіла з підвищеними періодами напівжиття та підвищеним зв'язуванням із неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідальний за передачу материнських IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) і Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описані в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Такі антитіла містять Fc ділянку з однією або декількома замінами в ній, які підвищують зв'язування Fc ділянки з FcRn. Такі Fc-варіанти включають варіанти із замінами за одним або декількома залишками Fc ділянки: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміну 434 залишку Fc ділянки (патент США № 7371826).

Відносно інших прикладів варіантів Fc ділянки див. також роботи Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988), патент США № 5648260, патент США № 5624821 і WO 94/29351.

с) Сконструйовані варіанти з цистеїновими замінами

Відповідно до деяких варіантів здійснення може бути необхідне створення сконструйованого химерного білка Fc, в якого один або декілька залишків Fc ділянки антитіла замінені цистеїновими залишками. Відповідно до певних варіантів здійснення замінені залишки перебувають на доступних сайтах Fc. У результаті заміни таких залишків цистеїном реакційно-здатні тілові групи розташовуються, таким чином, у доступних сайтах Fc і можуть бути використані для кон'югації Fc з іншими фрагментами, такими як лікарські фрагменти або лікарські фрагменти з лінкером, з утворенням імунокон'югату, який описаний у даному документі далі. Наприклад, на цистеїн можна замінити S400 (нумерація за EU) Fc ділянки важкого ланцюга. Див., наприклад, патент США № 7521541.

С. Реконбінантні способи та композиції

Поліпептиди IL-22 можна одержати за допомогою загальноприйнятих реконбінантних способів, наприклад, культивуванням клітин, трансформованих або трансфікованих вектором, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує поліпептид IL-22, його фрагмент або варіант або химерний білок, що містить їх же. Також даний винахід відноситься до клітин-хазяїнів, що містять такий вектор. Наприклад, клітинами-хазяїнами можуть бути клітини CHO, E. coli або дріжджів. Додатково, даний винахід відноситься до способу одержання будь-якого з описаних у

даному документі поліпептидів, і спосіб включає культивування клітин-хазяїнів в умовах, що підходять для експресії необхідного поліпептиду, і виділення необхідного поліпептиду з культури клітин.

Клітки-хазяїни трансфікують або трансформують за допомогою описаних у даному документі векторів експресії або клонуючих векторів для одержання поліпептиду IL-22 і культивують у традиційному живильному середовищі, відповідним чином модифікованому для індукції промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, що кодують необхідні послідовності. Фахівець у даній області може підібрати умови культивування, такі як середовище, температура, рН тощо, без невинуваченої постановки експерименту. У цілому, принципи, протоколи та практичні методики максимізації продуктивності культур клітин можна знайти в роботі *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) і *Sambrook et al.*, раніше.

Рядовим фахівцям у даній області відомі способи трансфекції, наприклад, за допомогою  $\text{CaPO}_4$  й електропорації. Залежно від використовуваної клітини-хазяїна трансформацію проводять за допомогою стандартних методик, що підходять для таких клітин. Кальцієву обробку з використанням хлориду кальцію, яка описана в роботі *Sambrook et al.*, раніше, або електропорацію зазвичай застосовують для прокариот або інших клітин, які мають серйозні бар'єри у формі клітинних стінок. Інфікування за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* застосовують для трансформації деяких рослинних клітин, як описано в роботі *Shaw et al.*, *Gene*, 23:315 (1983), і WO 89/05859, опублікованої 29 червня 1989 року. Для клітин ссавців без таких клітинних стінок, можна використовувати спосіб осадження фосфатом кальцію згідно з *Graham and van der Eb*, *Virology*, 52:456-457 (1978). Загальні аспекти трансформацій систем клітин-хазяїнів ссавців були описані у патенті США № 4399216. Трансформації дріжджів, як правило, здійснюють згідно зі способом, описаним в роботі *Van Solingen et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) і *Hsiao et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Проте, також можна застосовувати інші способи введення ДНК у клітини, такі як мікроін'єкція ядра, електропорація, злиття бактеріального протопласта з інтактними клітинами або за допомогою полікатіонів, наприклад, полібрена, поліорнітину. Для різних методик трансформації клітин ссавців див. роботу *Keown et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) і *Mansour et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Експресовані за допомогою рекомбінантних методик поліпептиди за даним винаходом можна виділити з культурального середовища або з лізатів клітин-хазяїнів. Ілюстрацією підходящих процедур очищення є наступні процедури: шляхом фракціонування на колонку для іонообмінної хроматографії; осадження в етанолі; звернено-фазова HPLC; хроматографія на силікагелі або на катіон-обмінній смолі, такій як DEAE; хроматофокусування; SDS-PAGE; фракціонування сульфатом амонію; гель-фільтрація із застосуванням, наприклад, *Sephadex G-75*; колонки з іммобілізованим на сефарозі білком А для видалення забруднюючих домішок, таких як IgG; і колонки для метал-хелатної хроматографії для зв'язування форм із міченим епітопом поліпептиду за даним винаходом. Можна використовувати різні способи очищення білка та такі способи відомі в даній області техніки й описані, наприклад, в роботі *Deutscher*, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); *Scopes*, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Вибраний етап(и) очищення будуть залежати, наприклад, від особливостей застосовуваного способу одержання та конкретного одержуваного поліпептиду.

Для одержання поліпептиду за даним винаходом можна використовувати альтернативні способи, які добре відомі з рівня техніки. Наприклад, послідовність, що кодує поліпептид або його частину, можна одержати шляхом безпосереднього синтезу пептидів із застосуванням твердофазних методик (див., наприклад, роботу *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 білків можна проводити із застосуванням ручних методик або шляхом автоматизації. Автоматизований синтез можна здійснити, наприклад, за допомогою синтезатора пептидів *Applied Biosystems Peptide Synthesizer* (Фостер Сіті, Каліфорнія) згідно з інструкціями виробника. Різні частини поліпептиду за даним винаходом або його частини можна окремо синтезувати хімічними способами й об'єднати за допомогою хімічних або ферментативних способів з одержанням повнорозмірного поліпептиду або його частини.

Відповідно до інших варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерних молекул, що містять будь-який з описуваних у даному документі поліпептидів, гібридизованих з гетерологічним поліпептидом або амінокислотою послідовністю. Приклади таких химерних молекул включають без обмеження будь-який з описаних у даному документі поліпептидів, гібридизованих з послідовністю-міткою епітопа або Fc ділянкою імуноглобуліну.

Підходящі клітини-хазяїни для клонування або експресії ДНК в описуваних у даному

документі векторах включають прокаріотичні, дріжджові клітини або клітини вищих еукаріот. Підходящі прокаріоти включають без обмеження еубактерії, такі як грам-негативні або грам-позитивні організми, наприклад, *Enterobacteriaceae* такі як *E. coli*. Загальнодоступні різні штами *E. coli*, такі як *E. coli* K12 штам MM294 (ATCC 31446); *E. coli* X1776 (ATCC 31537); *E. coli* штам W3110 (ATCC 27325) і K5 772 (ATCC 53635).

Крім прокаріот підходящими хазяїнами для клонування або експресії векторів, що кодують IL-22, є еукаріотичні мікроорганізми, такі як міцеліальні гриби або дріжджі. Широко використовуваним нижчим еукаріотичним мікроорганізмом-хазяїном є *Saccharomyces cerevisiae*.

Підходящі клітини-хазяїни для експресії глікозилизованого IL-22 одержують від багатоклітинних організмів. Приклади клітин безхребетних включають клітини комах, такі як *Drosophila* S2 і *Spodoptera* Sf9, а також рослинні клітини. Приклади придатних клітин-хазяїнів ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) і COS клітини. Більш конкретні приклади включають клітини CV1 нирки мавпи, трансформовані SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); клітини ембріональної нирки людини (293 або клітини 293, субклоновані для вирощування в суспензійній культурі, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); клітини яєчника китайського хом'ячка/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); мишачі клітини Сертолі (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); клітини легені людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); і клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51). Вважають, що вибір підходящої клітини-хазяїна відноситься до компетенції фахівця в даній області.

Нуклеїнова кислота (наприклад, кДНК або геномна ДНК), що кодує IL-22, може бути вставлена в реплікований вектор для клонування (ампліфікації ДНК) або для експресії. Загальнодоступні різні вектори. Вектор може мати форму, наприклад, плазміди, косміди, вірусної частинки або фага. Відповідну послідовність нуклеїнової кислоти можна вставити у вектор за допомогою ряду процедур. У цілому, ДНК вставляють у відповідний сайт(и) рестрикційної ендонуклеази за допомогою відомих з рівня техніки методик. Компоненти вектора зазвичай включають без обмеження одну або декілька з сигнальної послідовності, точки початку реплікації, один або декілька маркерних генів, енхансерний елемент, промотор і послідовність закінчення транскрипції. При побудові підходящих векторів, що містять один або декілька таких компонентів, використовують стандартні методики лігування, які відомі фахівцям у даній області.

Поліпептиди IL-22 можна одержати рекомбінантними способами не тільки прямо, але також в якості химерного поліпептиду з гетерологічним поліпептидом, який може являти собою сигнальну послідовність або інший поліпептид зі специфічним сайтом розщеплення на N-кінці зрілого білка або поліпептиду, а також химерний білок IL-22 Fc. У цілому, сигнальна послідовність може являти собою компонент вектора або вона може бути частиною ДНК IL-22, яка вставлена у вектор. Сигнальна послідовність може являти собою прокаріотичну сигнальну послідовність, вибрану, наприклад, з групи з лідерних послідовностей лужної фосфатази, пеніцилінази, 1 pp або термостійкого ентеротоксину II. Для секреції з дріжджів сигнальна послідовність може являти собою, наприклад, лідерну послідовність інвертази дріжджів, лідерну послідовність альфа фактора (у тому числі лідерні послідовності "--фактора *Saccharomyces* і *Kluuyveromyces*, останні описані у патенті США № 5010182) або лідерну послідовність кислої фосфатази, лідерну послідовність глюкоамілази *C. albicans* (EP 362179, опубліковано 4 квітня 1990 року) або сигнальну послідовність, описану в WO 90/13646, опублікованій 15 листопада 1990 року. При експресії в клітинах ссавців для керування секрецією білка можна застосовувати сигнальні послідовності ссавців, такі як сигнальні послідовності з секретованих поліпептидів того самого або родинних видів, а також лідерні послідовності секреції вірусів.

Як вектори експресії, так і клонуючі вектори містять послідовність нуклеїнової кислоти, яка дозволяє вектору реплікуватися в одній або декількох вибраних клітинах-хазяїнах. Такі послідовності добре відомі для ряду бактерій, дріжджів і вірусів. Точка початку реплікації з плазміди pBR322 підходить для більшості грам-негативних бактерій, точка початку реплікації плазміди 2: підходить для дріжджів, і різні вірусні точки початку реплікації (SV40, вірусу полііоми, аденовірусу, VSV або BPV) придатні для клонуючих векторів у клітинах ссавців.

Вектори експресії та клонуючі вектори зазвичайно будуть містити ген для відбору, що також називають селектованим маркером. Типові вектори для відбору кодують білки, які (а) надають стійкість до антибіотиків або іншим токсинів, наприклад, ампіциліну, неоміцину, метотрексату або тетрацикліну, (б) доповнюють відсутніми в ауксотрофа генами або (с) поставляють важливі живильні речовини, які не доступні зі складного середовища, наприклад, ген, що кодує D-аланінрацемазу для *Bacilli*.

Прикладом підходящих селектованих маркерів для клітин ссавців є маркер, який дозволяє

виявляти клітини здатні поглинати нуклеїнову кислоту IL-22, такий як DHFR або тимідинкіназа. Підходящою клітиною-хазяїном при використанні DHFR дикого типу є лінія клітин CHO, дефіцитних за активністю DHFR, одержувана й розмножувана як описано в роботі Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Підходящим геном для відбору для застосування в дріжджах є ген *trp1*, що присутній у дріжджовій плазміді YRp7 [див., наприклад, Stinchcomb et al., Nature, 282:39(1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. Ген *trp1* забезпечує маркер відбору для мутантного штаму дріжджів, які не можуть рости в триптофані, наприклад, ATCC № 44076 або PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Вектори експресії та клонуєчі вектори зазвичай містять промотор, функціонально пов'язаний з послідовністю нуклеїнової кислоти IL-22, керуючи синтезом іРНК. Добре відомі промотори, які впізнаються рядом потенційних клітин-хазяїнів. Промотори, що підходять для застосування з прокаріотичними хазяїнами, включають бета-лактамазні та лактозні промоторні системи [див., наприклад, Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], промотор лужної фосфатази, триптофанову (*trp*) промоторну систему [див., наприклад, Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36776] і гібридні промотори, такі як *tac* промотор [див., наприклад, deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Промотори для застосування у бактеріальних системах також будуть містити послідовність Шайна-Дальгарно (S.D.), функціонально пов'язану з ДНК, що кодує IL-22.

Приклади підходящих промоторних послідовностей для застосування з дріжджовими хазяїнами включають промотори для 3-фосфогліцераткінази [див., наприклад, Hitzeman et al., J. Biol. Chem, 255:2073 (1980)] або інших гліколітичних ферментів [див., наприклад, Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], таких як енолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфофруктокіназа, глюкоза-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, триозафосфатізомераза, фосфоглюкоізомераза та глюккіназа.

Іншими дріжджовими промоторами, які являють собою індуковані промотори, що мають додаткову перевагу транскрипції, контрольовану умовами росту, є промоторні ділянки для алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрому C, кислої фосфатази, деструктивних ферментів, асоційованих з метаболізмом азоту, металотіонеїну, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази та ферментів, відповідальних за утилізацію мальтози та галактози. Підходящі вектори та промотори для застосування при експресії в дріжджів додатково описані в EP 73657.

Транскрипція IL-22 з векторів у клітинах-хазяїнах ссавців контролюється, наприклад, промоторами, отриманими з геномів вірусів, таких як вірус полііми, вірус віспи курей (UK 2211504, опублікований 5 липня 1989 г), аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В і вірус мавп 40 (SV40), з гетерологічних промоторів ссавців, наприклад, актинового промотору або імуноглобулінового промотору, і з промоторів генів білків теплового шоку, за умови, що такі промотори сумісні з системами клітин-хазяїнів.

Транскрипцію ДНК, що кодує поліпептиди IL-22, вищими еукаріотами можна підвищити шляхом вставки у вектор енхансерної послідовності. Енхансери являють собою діючі в *cis*-положенні елементи ДНК, зазвичай довжиною приблизно від 10 до 300 п. о., які діють на промотор, підвищуючи його транскрипцію. Багато енхансерних послідовностей в цей час відомі з генів ссавців (глобіну, еластази, альбуміну,  $\alpha$ -фетопротейну й інсуліну). Проте, як правило, будуть застосовувати енхансер з вірусу еукаріотичної клітини. Приклади включають енхансер SV40 на кінцевій стороні точки початку реплікації (п. о. 100-270), енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер вірусу полііми на кінцевій стороні точки початку реплікації й енхансери аденовірусів. Енхансер може бути сплайсований у вектор у 5' або 3' положенні щодо кодуєчої послідовності IL-22, але переважно розташований у 5' положенні від промотору.

Вектори експресії, що застосовуються в еукаріотичних клітинах-хазяїнах (клітинах дріжджів, грибів, комах, рослин, тварин, людини або ядровмісних клітинах із інших багатоклітинних організмів), також будуть містити послідовності, необхідні закінчення транскрипції та для стабілізації іРНК. Такі послідовності зазвичай доступні з 5' і, іноді 3', кінця нетрансльованих ділянок еукаріотичних або вірусних ДНК або кДНК. Ці ділянки містять нуклеотидні сегменти, що транскрибуються у вигляді поліаденільованих фрагментів у нетрансльованій частині іРНК, що кодує IL-22.

Проте, інші способи, вектори та клітини-хазяїни, що підходять для адаптації до синтезу IL-22 у культурах рекомбінантних клітин хребетних, описані в роботі Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:4046 (1979); EP 117,060; і EP 117058.

Ампліфікацію й/або експресію генів можна вимірювати безпосередньо в зразку, наприклад, за допомогою традиційного саузерн-блоттингу, нозерн-блоттингу для кількісного аналізу

транскрипції іРНК [див., наприклад, Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], дот-блоттингу (аналізу ДНК) або гібридизації *in situ* із застосуванням відповідним чином міченого зонда, виходячи з наведених у даному документі послідовностей. Альтернативно, можна використовувати антитіла, які можуть розпізнавати конкретні дуплекси, включаючи дуплекси ДНК, дуплекси РНК і гібридні дуплекси ДНК-РНК або дуплекси ДНК-білок. Антитіла, у свою чергу, можна позначити та провести аналіз, у якому дуплекс пов'язаний з поверхнею так, що при утворенні дуплекса на поверхні можна детектувати наявність антитіла, що зв'язалося з дуплексом.

Альтернативно експресію генів можна виміряти за допомогою імунологічних способів, таких як імуногістохімічне фарбування клітин або зрізів тканин й аналіз культури клітин або рідин організму, для безпосередньої кількісної оцінки експресії продукту гена. Антитіла, придатні для імуногістохімічного фарбування й/або аналізу пробних рідин, можуть являти собою або моноклональні, або поліклональні та можуть бути отримані у будь-якого ссавця. Традиційно, антитіла можна одержати до поліпептиду IL-22 з нативною послідовністю, або до синтетичного пептиду на основі послідовностей ДНК, які наведені в даному документі, або до екзогенної послідовності, гібридизованої з ДНК IL-22 і кодуєчої специфічний епітоп антитіла.

Форми IL-22 можна виділити з культурального середовища або з лізатів клітин-хазяїнів. У випадку, якщо вони пов'язані з мембраною, його можна звільнити від мембрани за допомогою розчину підходящого детергенту (наприклад, Triton-X 100) або за допомогою ферментативного відщеплення. Клітини, що використовуються в експресії IL-22, можна зруйнувати різними фізичними або хімічними засобами, такими як цикл заморожування-відтаювання, обробка ультразвуком, механічне руйнування або за допомогою засобів, які лізують клітини.

Може бути необхідне очищення IL-22 від рекомбінантних білків або поліпептидів клітини. Ілюстрацією підходящих процедур очищення є наступні процедури: шляхом фракціонування на колонку для іонообмінної хроматографії; осадження в етанолі; звернено-фазова HPLC; хроматографія на силікагелі або на катіон-обмінній смолі, такий як DEAE; хроматофокусування; SDS-PAGE; фракціонування сульфатом амонію; гель-фільтрація із застосуванням, наприклад, Sephadex G-75; колонки з іммобілізованим на сефарозі білком А для видалення забруднюючих домішок, таких як IgG; і колонки для метал-хелатної хроматографії для зв'язування форм із міченим епітопом поліпептиду IL-22. Можна використовувати різні способи очищення білка та такі способи відомі в даній області техніки й описані, наприклад, в роботі Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Вибраний етап(и) очищення будуть залежати, наприклад, від особливостей застосовуваного способу одержання та конкретного одержуваного IL-22. Описані вище загальні способи можна також застосовувати для одержання химерного білка IL-2 Fc.

Аналогічним чином, химерні білки IL-22 Fc можна одержати за допомогою рекомбінантних способів і композицій, які описані, наприклад, в роботі *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) і *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA). Відповідно до одного варіанта здійснення даний винахід відноситься до виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує химерні білки IL-22 Fc. У відповідності з наступним варіантом здійснення даний винахід відноситься до одного або декількох утримуючих таку нуклеїнову кислоту векторів (наприклад, векторів експресії). У відповідності з наступним варіантом здійснення даний винахід відноситься до клітини-хазяїна, що містить таку нуклеїнову кислоту. Відповідно до одного варіанта здійснення клітина-хазяїн містить (наприклад, була ним трансформована) вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що становить химерний білок IL-22 Fc. Відповідно до деякого варіанта здійснення вектор являє собою вектор експресії. Відповідно до одного варіанта здійснення клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад, клітиною яєчника китайського хом'яка (CHO) або лімфоїдною клітиною (наприклад, клітиною Y0, NS0, Sp20). Відповідно до одного варіанта здійснення даний винахід відноситься до способу одержання химерного білка IL-22 Fc, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує наведений вище химерний білок IL-22 Fc, у підходящих для експресії химерного білка IL-22 Fc умовах і, необов'язково, виділення химерного білка IL-22 Fc з клітини-хазяїна (або культурального середовища клітин-хазяїнів).

Для рекомбінантного одержання химерного білка IL-22 Fc нуклеїнову кислоту, яка кодує химерний білок IL-22 Fc, наприклад, описуваний у даному документі, виділяють та вставляють в один або декілька векторів для наступного клонування й/або експресії в клітині-хазяїні. Така нуклеїнова кислота може бути легко виділена та секвенована за допомогою традиційних процедур (наприклад, шляхом застосування олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують химерний білок). Відповідно до деяких варіантів здійснення

при одержанні химерних білків IL-22 Fc нуклеїнову кислоту, яка кодує поліпептид IL-22 або його фрагмент, можна лігувати із нуклеїновою кислотою, яка кодує послідовність константного домена імуноглобуліну в заданому положенні на константному домені, з одержанням у результаті химери з Fc на C-кінці IL-22; проте також можливі N-кінцеві химери.

Як приклад побудови химерного білка IL-22 Fc, ДНК, що кодує IL-22, розщеплюють за допомогою рестрикційного ферменту на 3' кінці, або поблизу від нього, ДНК, що кодує IL-22, і в точці на або поблизу ДНК, що кодує N-кінець зрілого поліпептиду (при цьому передбачене застосування різних лідерних послідовностей) або на ділянці, що кодує N-кінець, або поблизу неї, для повнорозмірного білка IL-22 (в якому використовують нативну сигнальну послідовність). Потім такий фрагмент ДНК легко вставити в ДНК, що кодує константну ділянку легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну, і, при необхідності, змінити за допомогою делеційного мутагенезу. Переважно, це буде імуноглобулін людини, якщо химерний білок призначений для *in vivo* терапії для людей.

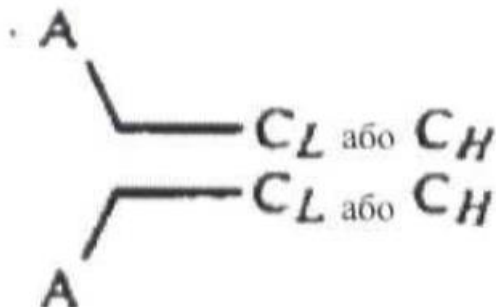
Відповідно до деяких варіантів здійснення IL-22-імуноглобулінові химерні молекули збирають у вигляді мономерів, гетеро- або гомомультимерів або у вигляді димерів або тетрамерів. Зазвичай, такі зібрані імуноглобуліни будуть мати відомі структури одиниць, які представлені за допомогою наведених далі схем. Основною чотириланцюговою структурною одиницею є форма, в якій існують IgG, IgD і IgE. Чотириланцюгова одиниця повторюється в імуноглобулінах з більш високою молекулярною масою; IgM зазвичай існує у формі пентамеру з основних чотириланцюгових одиниць, які утримуються одна з одною за допомогою дисульфідних зв'язків. Глобулін IgA, і іноді глобулін IgG, також може існувати в сироватці в мультимірній формі. У випадку мультимерів кожна чотириланцюгова одиниця може бути однаковою або відрізнитися. Див. також Caron et al., патент США № 5116964, включений у даний документ за допомогою посилання у повному його об'ємі.

На наведених в даному документі схемах "A" означає щонайменше частину партнера із зв'язування (такого як IL-22), що містить сайт зв'язування, який може зв'язуватися зі своїм лігандом або рецептором (таким як IL-22 R); X являє собою додатковий засіб, який може являти собою інший функціональний партнер із зв'язування (такий самий як A або інший), поліпептид з множини субодиниць (ланцюгів), як зазначено вище (наприклад, інтегрин), частину члена імуноглобулінового суперсімейства, таку як варіабельна ділянка або домен, подібний до варіабельної ділянки, у тому числі варіабельна ділянка нативного або химерного імуноглобуліну, токсин, такий як екзотоксин синегнойної палички або рицин, або поліпептидний терапевтичний засіб, який в інших випадках нормально не асоціюється з константним доменом; і VL, VH, CL і CH являють собою варіабельні або константні домени легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну. Зрозуміло, що ці схеми є лише ілюстрацією загальних зібраних імуноглобулінових структур і не охоплюють всі варіанти. Наприклад, зрозуміло, що у будь-якій з цих конструкцій за бажанням можуть бути декілька "A" або "X".

мономер

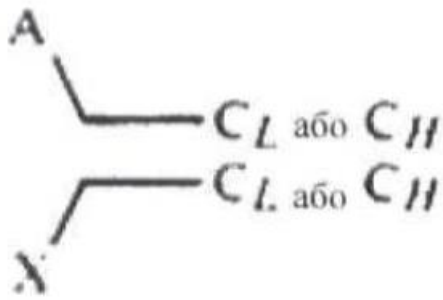


гомодимер

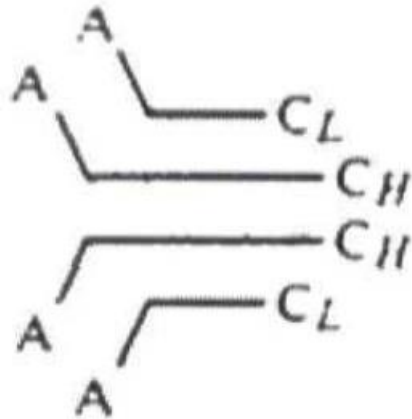


гетеродимер

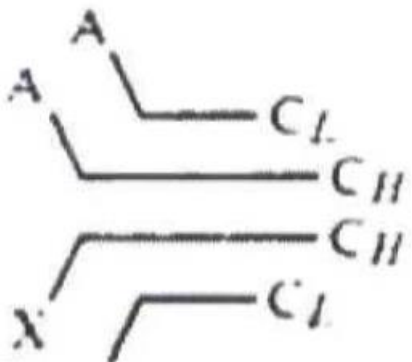




гомотетрамер

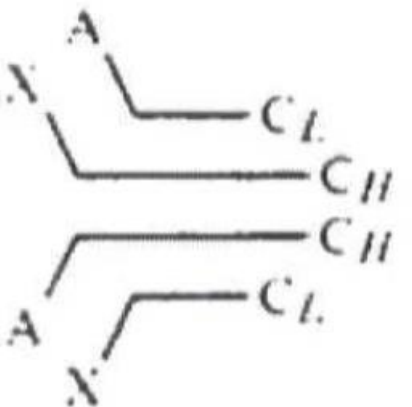


гетеротетрамери



5

i

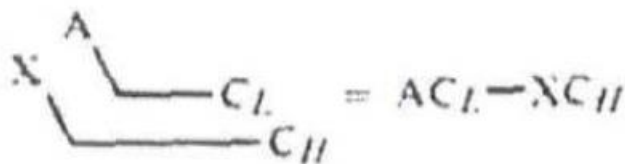
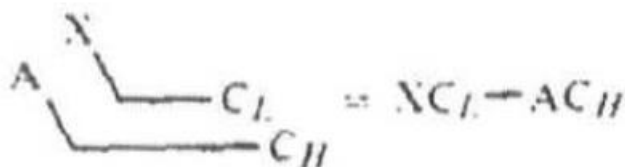
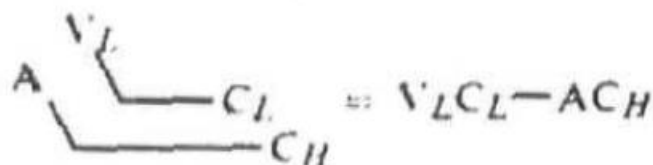
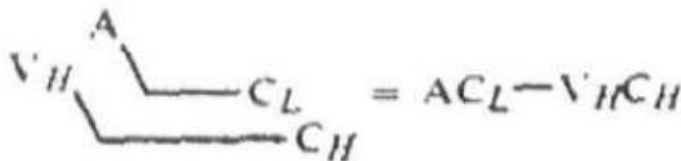
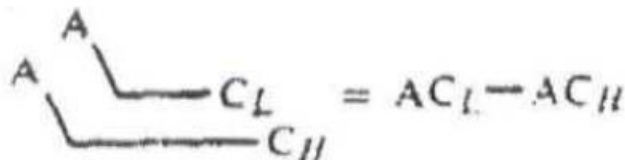
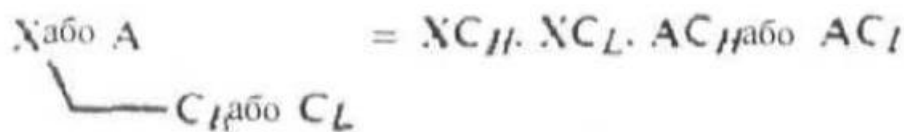


Зрозуміло, що такі схеми є лише ілюстративними, і вважають, що ланцюги мультимерів зв'язані дисульфідними зв'язками в такий самий спосіб, як і в нативних імуноглобулінах.

10

Відповідно до даного винаходу гібридні імуноглобуліни легко секретуються з клітин ссавців, трансформованих відповідною нуклеїновою кислотою. Секретовані форми включають форми, в яких епітоп партнера із зв'язування присутній в димерах важкого ланцюга, мономерах або димерах легкого ланцюга та гетеротетрамерах важкого й легкого ланцюгів, причому епітоп партнера із зв'язування присутній в гібридизованому стані з одним або декількома легкими або важкими ланцюгами, включаючи гетеротетрамери, в яких заміщені включно до всіх чотирьох аналогів варіабельних ділянок. Таким чином, у випадку наявності відмінного від партнера із зв'язування домена, який подібний варіабельному, у важкого-легкого ланцюга, одержують гетерофункціональне антитіло.

Для складання мономерів і гетеро- і гомомультимерів імуноглобулінів за даним винаходом можна використовувати ланцюги або основні одиниці з різною структурою. Конкретні приклади таких основних одиниць показані на наведеній нижче схемі та зазначені їхні еквіваленти (для наведених нижче скорочених форм формул).



15

Різні ілюстративні зібрані нові імуноглобуліни, отримані відповідно до даного винаходу, схематично наведені нижче. Крім символів, значення яких описано вище, п являє собою ціле число, а Y означає зшитий за допомогою ковалентного зв'язку фрагмент.

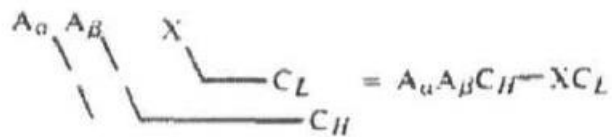
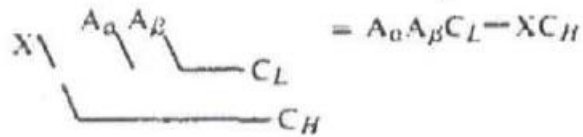
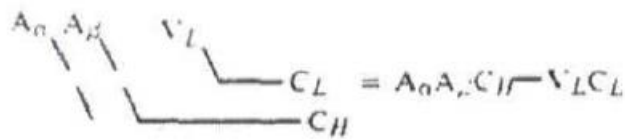
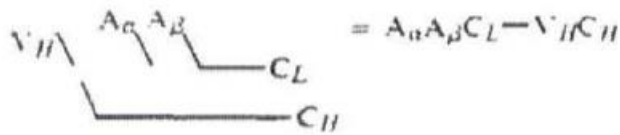
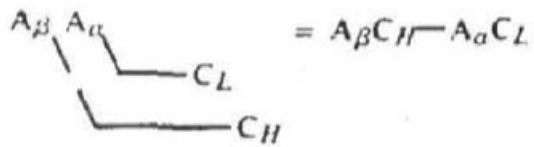
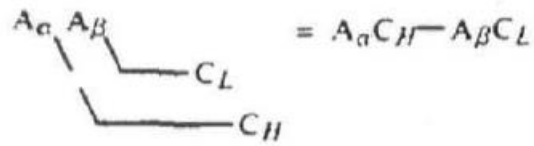
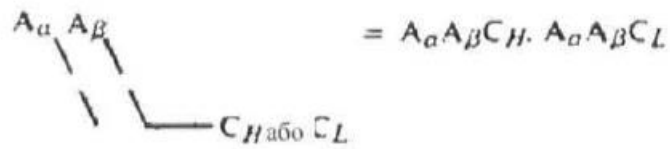
- (a)  $AC_L$ ;  
 (b)  $AC_L \sim AC_L$ ;  
 (c)  $AC_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, V_L C_L - V_H C_H, X C_H, X C_L, X C_L - X C_H, X C_L - V_H C_H, X C_H - V_L C_L, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;  
 (d)  $AC_L - AC_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, V_L C_L - V_H C_H, X C_H, X C_L, X C_L - X C_H, X C_L - V_H C_H, X C_H - V_L C_L, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;  
 (e)  $AC_L - V_H C_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, V_L C_L - V_H C_H, X C_H, X C_L, X C_L - X C_H, X C_L - V_H C_H, X C_H - V_L C_L, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;  
 (f)  $V_L C_L - AC_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, V_L C_L - V_H C_H, X C_H, X C_L, X C_L - X C_H, X C_L - V_H C_H, X C_H - V_L C_L, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;  
 (g)  $[A - Y]_n - [V_L C_L - V_H C_H]_2$ ;  
 (h)  $X C_H \text{ або } X C_L - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;  
 (i)  $X C_L - X C_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;  
 (j)  $X C_L - V_H C_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]^2$ ;  
 (k)  $X C_H - V_L C_L - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;  
 (l)  $X C_L - AC_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, V_L C_L - V_H C_H, X C_H, X C_L, X C_L - X C_H, X C_L - V_H C_H, X C_H - V_L C_L, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;  
 (m)  $AC_L - X C_H - [AC_H, AC_L - AC_H, AC_L - V_H C_H, V_L C_L - AC_H, V_L C_L - V_H C_H, X C_H, X C_L, X C_L - X C_H, X C_L - V_H C_H, X C_H - V_L C_L, X C_L - AC_H, \text{або } AC_L - X C_H]$ ;

5 А, Х, V або С можуть бути модифіковані за допомогою зшитого ковалентним зв'язком фрагмента (Y) так, що вони будуть являти собою  $(A-Y)_n$ ,  $(X-Y)_n$  тощо.

Партнер із зв'язування А (такий як IL-22) також може являти собою багатоланцюгову молекулу, наприклад, з ланцюгами, які умовно позначені як  $A_\alpha$  і  $A_\beta$ . Ці ланцюги у вигляді одиниці розташовані на сайтах, про яких згадано вище для окремого ланцюга "А". Один із множинних ланцюгів гібридизований з одним ланцюгом імуноглобуліну (причому ланцюги, що залишилися, кovalентно або нековалентно пов'язані з гібридизованим ланцюгом звичайним чином), або

10 якщо партнер із зв'язування ліганду містить два ланцюги, то один ланцюг окремо гібридизований з легким ланцюгом імуноглобуліну, а інший ланцюг – з важким ланцюгом імуноглобуліну.

15 Основні одиниці зі структурами, які показані на наведеній нижче схемі, є прикладами основних одиниць, що застосовують для створення мономерів і гетеро- і гомомультимерів, особливо димерів і тримерів із багатоланцюговими партнерами із зв'язування ліганду:



5 Нижче схематично представлені різні ілюстративні нові зібрані антитіла з дволанцюговими партнерами із зв'язування ліганду ("A<sub>α</sub> і A<sub>β</sub>"), що використовують в структурах одиниць, які наведені вище.

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

У наведених вище таблицях у показаних структурах видні лише основні особливості, наприклад, у них не показані ні з'єднуючі елементи (J) або інші домени імуноглобулінів, ні дисульфідні зв'язки. Вони опущені заради стислості. Проте, якщо такі домени необхідні для сполучної активності, їх слід будувати так, щоб вони були присутні у звичайних положеннях, які вони займають у партнері із зв'язування або молекулах імуноглобуліну залежно від конкретного випадку.

ДНК, що кодує константні ділянки легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну, відома, або може бути легко отримана з бібліотек кДНК, або ж синтезована. Див., наприклад, 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 286:286-288 (1982); i Morrison et al; Ann. Rev. Immunol. 2:239-256 (1984). У даному документі наведена послідовність ДНК, що кодує IL-22 людини з ендогенною лідерною послідовністю (SEQ ID NO:70). Послідовності ДНК, що кодують інших необхідних партнерів із зв'язування, які відомі або можуть бути легко отримані з бібліотек кДНК, є підходящими для здійснення даного винаходу на практиці.

ДНК, що кодує химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом, трансфікують у клітину-хазяїна для експресії. Якщо необхідні мультимери, то клітину-хазяїна трансформують за допомогою ДНК, що кодує кожний ланцюг, який буде становити мультимер, причому клітину-хазяїна оптимально вибрати таку, щоб вона могла збирати ланцюги мультимерів необхідним чином. Якщо клітина-хазяїн виробляє імуноглобулін до трансфекції, то необхідно лише трансфікувати партнером із зв'язування, гібридизованим з легким або з важким ланцюгом, з одержанням гетероантитіла. Вищезгадані імуноглобуліни з одним або декількома плечима, що несуть домен партнера із зв'язування, і одним або декількома плечима, що несуть парні варіабельні ділянки, дають у результаті подвійну специфічність до ліганду партнера із зв'язування та до антигена або терапевтичного фрагменту. Множину одночасно трансформованих клітин застосовують з описаними вище рекомбінантними способами для одержання поліпептидів із множинними

специфічностями, таких як описувані вище гетеротетрамерні імуноглобуліни.

Хоча наявність легкого ланцюга імуноглобуліну не є необхідною в імуноадгезинах за даним винаходом, легкий ланцюг імуноглобуліну може бути присутнім рівною мірою ковалентно пов'язаним з химерним поліпептидом з важким ланцюгом імуноглобуліну й IL-22. У цьому випадку ДНК, що кодує легкий ланцюг імуноглобуліну, зазвичай спільно експресується з ДНК, що кодує химерний білок з важким ланцюгом імуноглобуліну й IL-22. При секреції гібридний важкий ланцюг і легкий ланцюг будуть ковалентно зв'язуватися з утворенням імуноглобулін-подібної структури, що містить дві, зв'язані дисульфідними зв'язками, пари легкий ланцюг-важкий ланцюг імуноглобуліну. Способи, які підходять для одержання таких структур, розкриті, наприклад, у патенті США № 4816567, виданому 28 березня 1989 року. Підходящі клітини-хазяїни для клонування або експресії, що кодують цільові білки векторів, включають описувані в даному документі прокаріотичні або еукаріотичні клітини. Наприклад, химерний білок IL-22 може продукуватися у бактерій, особливо якщо в глікозилювання та Fc-ефекторна функція не є необхідними або завдають шкоди. Для експресії поліпептидів у бактеріях, див., наприклад, патенти США № 5648237, 5789199 і 5840523. (Див. також Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, в якій описана експресія фрагментів антитіл в *E. coli*.) Після експресії химерний білок Fc може бути виділений з бактеріальної клітинної маси в розчинній фракції та може бути додатково очищений. Як проілюстровано в розділі прикладів, способи додаткового очищення включають без обмеження очищення із застосуванням колонки з білком А.

Крім прокаріот, еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі, є підходящими хазяїнами для клонування або експресії, у тому числі штами грибів і дріжджів, чий шлях глікозилювання були "гуманізовані", що призводить у результаті до продукування антитіла з частково або повністю людським профілем глікозилювання. Див. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) і Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Підходящі клітини-хазяїни для експресії глікозилюваних білків також одержують від багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин і комах. Була виявлена множина бакуловірусних штамів, які можуть бути використані в комбінації з клітинами комах, зокрема, для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Культури рослинних клітин також можна використовувати в якості хазяїнів. Див., наприклад, патенти США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (що описують методику PLANTIBODIES<sup>TM</sup> для одержання антитіл в трансгенних рослинах).

В якості хазяїнів також можуть бути використані клітини хребетних. Наприклад, можуть бути придатні лінії клітин ссавців, які адаптовані для росту в суспензії. Іншими прикладами придатних ліній клітин-хазяїнів ссавців є лінія CV1 клітин нирки мавпи, трансформована за допомогою SV40 (COS-7); лінія клітин первинної нирки людини (293 або клітини 293, яка описана, наприклад, в роботі Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59(1977)); клітини нирки новонародженого хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (клітини TM4, які описані, наприклад, в роботі Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251(1980)); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини цервікальної карциноми людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки пацюка лінії buffalo (BRL 3A); клітини легень людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, які описані, наприклад, в роботі Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); MRC 5 клітини та FS4 клітини. Інші придатні лінії клітин-хазяїнів ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), у тому числі клітини DHFR-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216(1980)); і лінії мієломних клітин, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд деяких підходящих для продукування антитіла ліній клітин-хазяїнів ссавців див., наприклад, в роботі Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

#### D. Агоністи IL-22

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до агоністів IL-22 для варіантів здійснення способу. Агоністи IL-22 мають біологічну активність IL-22, як зазначено в даному документі. Відповідно до одного варіанта здійснення агоніст IL-22 являє собою антитіло. Відповідно до деяких варіантів здійснення антитіло до IL-22 являє собою агоністичне антитіло, яке стимулює взаємодію IL-22 з IL-22R. Відповідно до окремого варіанта здійснення агоніст IL-22 являє собою антитіло, яке зв'язує IL-22BP, і блокує або інгібує зв'язування IL-22BP з IL-22 і, таким чином, індукує або підвищує активність IL-22 (наприклад, зв'язування з IL-22R). Відповідно до іншого варіанта здійснення агоніст IL-22 являє собою олігопептид, який зв'язується з IL-22. Олігопептиди можна синтезувати хімічними способами із застосуванням



технології синтезу олігопептидів або можна одержати й очистити із застосуванням рекомбінантної технології. Такі олігопептиди зазвичай становлять щонайменше 5 амінокислот у довжину, альтернативно, щонайменше приблизно 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 або 100 амінокислот у довжину. Такі олігопептиди можна виявити без невинуваченої постановки експерименту із застосуванням добре відомих методик. Щодо цього слід зазначити, що методики скринінгу бібліотек олігопептидів, які можуть специфічно зв'язуватися з поліпептидом-мішенню, добре відомі з рівня техніки (див., наприклад, патенти США №№ 5556762, 5750373, 4708871, 4833092, 5223409, 5403484, 5571689, 5663143; публікації РСТ № WO 84/03506 і 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, і Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

Відповідно до ще одного варіанта здійснення агоніст IL-22 за даним винаходом являє собою органічну молекулу, яка зв'язується з IL-22, відмінну від олігопептиду або антитіла, які описані в даному документі. Органічна молекула може являти собою, наприклад, малу молекулу. Органічну молекулу, яка зв'язується з IL-22, можна виявити та синтезувати хімічними способами із застосуванням відомої методології (див., наприклад, публікації РСТ заявок №№ WO00/00823 і WO00/39585). Такі органічні молекули зазвичай мають розмір менше ніж приблизно 2000 дальтон, альтернативно, мають розмір менше ніж приблизно 1500, 750, 500, 250 або 200 дальтон, причому такі органічні молекули, які можуть зв'язуватися з IL-22 за даним винаходом, можна виявити без невинуваченої постановки експерименту із застосуванням добре відомих методик. Щодо цього слід зазначити, що методики скринінгу бібліотек органічних молекул відносно молекул, які можуть зв'язуватися з поліпептидом-мішенню, добре відомі з рівня техніки (див., наприклад, публікації РСТ №№ WO00/00823 і WO00/39585). Відповідно до окремого варіанта здійснення агоніст IL-22 являє собою органічну молекулу, яка зв'язує IL-22BP, і блокує або інгібує зв'язування IL-22BP з IL-22 і, таким чином, індукуює або підвищує активність IL-22 (наприклад, зв'язування з IL-22R). Відповідно до ще одного варіанта здійснення даний винахід відноситься до агоністів IL-22. Ілюстративні агоністи включають без обмеження нативний IL-22 або IL-22R; фрагменти, варіанти або модифіковані форми IL-22 або IL-22R, які зберігають щонайменше одну активність нативного поліпептиду; засоби, які можуть зв'язувати й активувати IL-22R; і засоби, які індукують надекспресію IL-22 або IL-22R або нуклеїнових кислот, що кодують IL-22 або IL-22R.

#### Е. Аналізи

Запропонований згідно з даним винаходом химерний білок IL-22 Fc можна виявити, відібрати при скринінгу або охарактеризувати за його фізичними/ хімічними властивостями і/або біологічними активностями за допомогою різних відомих з рівня техніки аналізів.

##### 1. Аналізи зв'язування й інші аналізи

Відповідно до одного аспекту химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом тестують у відношенні його рецептор-сполучної активності, наприклад, за допомогою таких відомих способів, як ELISA, вестерн-блоттинг, зв'язування на клітинній поверхні за Скетчардом, поверхневий плазмонний резонанс. Відповідно до іншого аспекту для виявлення антитіла, яке конкурує з химерним білком IL-22 Fc за зв'язування з рецептором IL-22, можна використовувати конкурентні аналізи. Відповідно до іншого аспекту химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом можна застосовувати для детекції наявності або кількості рецептора IL-22 або IL22-сполучного білка (розчинного рецептора), присутнього у біологічному зразку. Відповідно до іншого аспекту химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом можна застосовувати для детекції наявності або кількості рецептора IL-22, присутнього у біологічному зразку. Відповідно до деяких варіантів здійснення біологічний зразок спочатку блокують неспецифічним ізотиповим контрольним антитілом для насичення всіх Fc рецепторів у зразку.

##### 2. Аналізи активності

Відповідно до одного аспекту запропоновані аналізи для виявлення біологічної активності химерного білка IL-22 Fc. Біологічна активність поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc може включати, наприклад, зв'язування з рецептором IL-22, стимуляцію проведення сигналу IL-22 й індукцію експресії STAT3, RegIII і/або ПанкреPAP. Додатково, у випадку серцево-судинного

захворювання або стану біологічна активність може включати вплив на формування атеросклеротичних бляшок, зокрема для придушення формування атеросклеротичних бляшок. Інгибування формування бляшок можна оцінити будь-яким підходящим способом візуалізації, відомим фахівцю в даній області.

#### 5 F. Кон'югати

Даний винахід також відноситься до кон'югатів, які включають описаний у даному документі химерний білок IL-22 Fc, що кон'югують з одним або декількома засобами для детекції, формування складів, збільшення періоду напівжиття, зменшення імуногенності або проникнення в тканини. Ілюстративна кон'югація включає без обмеження пегілювання та приєднання радіоактивних ізотопів.

Відповідно до іншого варіанта здійснення кон'югат включає описаний у даному документі химерний білок IL-22 Fc, кон'югований з радіоактивним атомом з утворенням радіокон'югату. Для одержання радіокон'югатів доступний ряд радіоактивних ізотопів. Приклади включають At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> і радіоактивні ізотопи Lu. При застосуванні радіокон'югату для детекції він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад, tc99m або I123, або спінову мітку для ядерної магнітно-резонансної (NMR) візуалізації (також відомої як магнітно-резонансна візуалізація, mri), таку як знов-таки йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

#### 20 G. Способи та композиції для детекції

Відповідно до деяких варіантів здійснення будь-яка із запропонованих у даному документі химер IL-22 Fc придатна для детекції наявності рецептора IL-22 у біологічному зразку. Відповідно до деяких варіантів здійснення спосіб додатково включає етап блокування всіх Fc рецепторів у зразку за допомогою неспецифічного ізотипового контрольного антитіла. Застосовуваний у даному документі термін "детекція" охоплює кількісну й якісну детекцію. Відповідно до деяких варіантів здійснення біологічний зразок містить клітину або тканину, таку як епітеліальні тканини.

Відповідно до одного варіанта здійснення даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування в способі детекції. Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу детекції наявності рецептора IL-22 у біологічному зразку. Відповідно до деяких варіантів здійснення спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка з описаним у даному документі химерним білком IL-22 Fc в умовах, що дозволяють зв'язування химерного білка IL-22 Fc з рецептором IL-22, і детекцію того, чи сформувався комплекс між химерним білком IL-22 Fc і рецептором IL-22. Відповідно до деяких варіантів здійснення спосіб додатково включає етап блокування всіх Fc рецепторів у зразку за допомогою неспецифічного ізотипового контрольного антитіла. Такий спосіб може являти собою *in vitro* або *in vivo* спосіб. Відповідно до одного варіанта здійснення химерний білок IL-22 Fc застосовують для вибору суб'єктів, прийнятих для терапії за допомогою химерного білка IL-22 Fc, наприклад, якщо рецептор IL-22 являє собою біомаркер для вибору хворих.

Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерних білків IL-22 Fc. Мітки включають без обмеження мітку або фрагменти, які детектують безпосередньо (такий як флуоресцентні, хромофорні, електронощільні, хемілюмінісцентні та радіоактивні мітки), а також фрагменти, такі як ферменти або ліганди, які детектують опосередковано, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярної взаємодії. Ілюстративні мітки включають без обмеження радіоізотопи <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H і <sup>131</sup>I, флуорофори, такі як рідкісноземельні хелати або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люцифераза світлячка та бактеріальна люцифераза (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофалазинедіони, пероксидазу хрону (HRP), лужну фосфатазу, β-галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, сахарид-оксидази, наприклад, глюкозооксидаза, галактооксидаза та глюкоза-6-фосфатдегідрогеназа, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа та ксантинооксидаза, зшиті з ферментом, який використовує перекис водню для окиснення вихідного барвника, таким як HRP, лактопероксидаза, або мікропероксидаза, біотин/авідин, спінові мітки, мітки на основі бактеріофагів, стійкі вільні радикали й ін.

#### 55 H. Фармацевтичні склади

Композиції на основі IL-22 (які відповідно до деяких варіантів здійснення включають химерні білки IL-22 Fc і поліпептид IL-22 або агоністи) згідно з даним винаходом будуть складати в суміш, розділяти на дози й вводити таким чином, щоб це відповідало вимогам належної медичної практики. Розглянуті в даному контексті фактори включають конкретне порушення, що зазнає лікування, конкретного ссавця, що зазнає лікування, клінічний стан окремого суб'єкта,



причину порушення, місце доставки засобу, спосіб введення, схему введення й інші фактори, відомі практикуючим лікарям. Відповідно до одного варіанта здійснення композицію можна застосовувати для збільшення тривалості існування людини, підданої розвитку або з діагнозом захворювання або хворобливого стану. Тривалість існування визначають як час від першого введення лікарського засобу до смерті.

Фармацевтичні складки готують за допомогою відомих з рівня техніки стандартних способів, які включають змішування активного інгредієнта, що має необхідний ступінь чистоти, з одним або декількома необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) i Remington's Pharmaceutical Sciences 20<sup>th</sup> edition, ed. A. Fgennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa) у формі ліофілізованих складів або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії зазвичай є нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозуваннях і концентраціях і включають без обмеження буфери, такі як фосфатний, цитратний і з іншими органічними кислотами; антиоксиданти, у тому числі аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонію хлорид; гексаметамонію хлорид; бензалконію хлорид; бензетонію хлорид; феноловий, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехін; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і м-крезол); низькомолекулярні (менше ніж приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, у тому числі глюкозу, маннозу або декстрини; хелатоутворюючі засоби, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, манніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; комплексні сполуки металів (наприклад, комплексна сполука Zn-білок); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (PEG). Ілюстративні фармацевтично прийнятні носії в даному документі додатково включають засоби диспергування лікарських засобів у міжклітинному просторі, такі як розчинні глікопротеїни гіалуронідази з нейтральною активністю (sHASEGP), наприклад, людські розчинні глікопротеїни гіалуронідази PH-20, такі як rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Деякі ілюстративні sHASEGP і способи застосування, що включають rHuPH20, описані у публікації у патентах США № 2005/0260186 і № 2006/0104968. Відповідно до одного аспекту sHASEGP комбінують з одним або декількома додатковими глюкозаміногліканами, такими як хондроїтинази.

Необов'язково, але переважно, склад містить фармацевтично прийнятну сіль, переважно хлорид натрію та переважно у приблизно фізіологічних концентраціях.

Необов'язково, складки за даним винаходом можуть містити фармацевтично прийнятний консервант. Відповідно до деяких варіантів здійснення концентрація консерванту варіює в діапазоні від 0,1 до 2,0 %, зазвичай в об'ємному вмісті. Підходящі консерванти включають консерванти, відомі в області фармацевтики. Переважними консервантами є бензиловий спирт, фенол, м-крезол, метилпарабен, бензалконію хлорид і пропілпарабен. Необов'язково, складки за даним винаходом можуть включати фармацевтично прийнятну поверхнево-активну речовину в концентрації від 0,005 до 0,02 %.

Склад за даним винаходом також може містити більше однієї активної сполуки при необхідності для конкретного симптому, що зазнає лікування, переважно сполуки з доповнюючими активностями, які не виявляють негативної дії одна на одну. Такі молекули переважно присутні в комбінації в кількостях, які є ефективними для досягнення поставленої мети.

Ілюстративні ліофілізовані складки описані у патенті США № 6267958. Водні складки включають складки, описані у патенті США № 6171586 і WO2006/044908, причому останні складки включають гістидин-ацетатний буфер.

Склад за даним винаходом також може містити більше одного активного інгредієнта при необхідності для конкретного симптому, що зазнає лікування, переважно сполуки з доповнюючими активностями, які не виявляють негативної дії одна на одну. Наприклад, може бути необхідно додаткове внесення стероїду, антагоніста TNF або інших протизапальних терапевтичних засобів. Такі активні інгредієнти переважно присутні в комбінації в кількостях, які є ефективними для досягнення поставленої мети.

Активні інгредієнти можуть бути укладені в мікрокапсули, отримані, наприклад, за допомогою методик коацервації або за допомогою полімеризації за межею розділу фаз, наприклад, гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули та полі-(метилметакрилатні) мікрокапсули, відповідно, у колоїдних системах для доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки та нанокапсули) або в макроемульсіях. Такі методики описані в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol,

A. Ed. (1980).

Можна приготувати препарати з уповільненим вивільненням. Підходящі приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять химерний білок IL-22 Fc, причому такі матриці мають форму виробів з певною формою, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриць з уповільненим вивільненням включають складні поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетил-метакрилат) або полі(вініловий спирт)), полілактиди (патент США № 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти та гамма-етил-L-глутамату, етиленвінілацетат, що не розкладається, співполімери молочної кислоти та гліколевої кислоти, що розкладаються, такі як LUPRON DEPOT™ (ін'єкційні мікросфери, що містять в складі співполімер молочної кислоти та гліколевої кислоти і лейпролідацетат) і полі-D-(-)- 3-гідроксимасляну кислоту. Незважаючи на те, що такі полімери, як етиленвінілацетат і співполімер молочної кислоти та гліколевої кислоти забезпечує вивільнення молекул протягом більше 100 днів, деякі гідрогелі вивільняють білки протягом більш коротких періодів часу. Якщо укладені в капсулу антитіла залишаються в організмі протягом тривалого періоду часу, вони можуть денатурувати або утворювати агрегат у результаті впливу вологи при 37 °C, що у підсумку призводить до втрати біологічної активності та можливих змін в імуногенності. Залежно від задіяного механізму, можна розробити раціональні стратегії для стабілізації. Наприклад, якщо виявлено, що механізм агрегації являє собою формування міжмолекулярних S-S зв'язків у результаті тіо-дисульфідного взаємообміну, то стабілізації можна досягти шляхом модифікації сульфгідрильних залишків, ліофілізації з кислотних розчинів, контролю над вмістом вологи, застосування відповідних добавок і розробки специфічних полімерних матричних композицій.

Фармацевтичну композицію для місцевого застосування можна скласти в суміш, наприклад, у формі гелю для місцевого застосування. Див., наприклад, US 4717717, US 5130298, US 5427778, US 5457093, US 5705485, US 6331309 і WO2006/138468. Відповідно до деяких варіантів здійснення композицію можна скласти в суміш у присутності похідних целюлози. Відповідно до інших певних варіантів здійснення склад для місцевого застосування перед застосуванням можна відновити з ліофілізованого складу за допомогою достатньої кількості буфера або розріджувача. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc складають в суміш для місцевого застосування на суб'єкті з порушенням загоєння епітеліальних ран. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення загоєння епітеліальних ран відбувається на шкірі. Відповідно до деяких інших певних варіантів здійснення суб'єктом є людина з порушенням загоєння ран. Відповідно до інших певних варіантів здійснення склад для місцевого застосування, що містить химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом, можна застосовувати для поліпшення загоєння ран після внутрішніх або зовнішніх хірургічних розрізів.

Відповідно до одного варіанта здійснення даного винаходу поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc для застосування у прискоренні, стимуляції або поліпшенні загоєння ран перебуває в складі гелю для місцевого застосування, наприклад, у попередньо заповненому шприці або ємності, або альтернативно сполуку за даним винаходом можна змішувати з гелевою матрицею безпосередньо перед місцевим застосуванням на хворому. Відповідно до деяких варіантів здійснення також застосовують місцево додатковий терапевтичний засіб, або одночасно, або послідовно. Також необов'язково можна застосовувати інші шляхи введення, наприклад, вводити за допомогою будь-якого підходящого способу, включаючи без обмеження парентеральне, підшкірне, внутрішньочеревинне, внутрішньолегеневе, інтрацереброспинальне, підшкірне, інтраартикулярне, внутрішньосуглобне, підоболонкове, пероральне й інтраназальне введення. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревинне або підшкірне введення.

Як правило, для загоєння ран поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc складають в суміш для сайт-специфічної доставки. При місцевому нанесенні поліпептид IL-22 або химеру IL-22 Fc переважно комбінують з іншими інгредієнтами, такими як носії й/або ад'юванти. Обмеження за природою таких інших інгредієнтів відсутні, за винятком того, що вони повинні бути фармацевтично прийнятними й ефективними для їхнього задуманого застосування та не можуть знижувати активність активних інгредієнтів композиції. Приклади підходящих наповнювачів включають мазі, креми, гелі, спреї або суспензії з очищеним колагеном або без нього. Композиціями також можна просочити стерильні пов'язки, трансдермальні пластирі, пластирі та бинти, необов'язково в рідкій або напівтвердій формі. Також можна застосовувати матриці з окисненої регенованої целюлози/ колагену, наприклад, PROMOGRAN Matrix Wound Dressing або PROMOGRAN PRISMA MATRIX.

Можна приготувати препарати з уповільненим вивільненням. Підходящі приклади

препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять поліпептид за даним винаходом, причому такі матриці мають форму виробів з певною формою, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриць з уповільненим вивільненням включають складні поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетил-метакрилат) або полі(вініловий спирт)), полілактиди (патент США № 3773919), співполімер L-глутамінової кислоти та гамма-етил-L-глутамату, етиленвінілацетат, що не розкладається, співполімери молочної кислоти та гліколевої кислоти, що розкладаються, такі як LUPRON DEPOT™ (ін'єкційні мікросфери, що містять в складі співполімер молочної кислоти та гліколевої кислоти і лейпролідацетат), співполімер молочної та гліколевої кислоти (PLGA) і полі-D-(-)-3-гідроксимасляну кислоту. Незважаючи на те, що такі полімери, як етиленвінілацетат і співполімер молочної кислоти та гліколевої кислоти забезпечують вивільнення молекул протягом більше 100 днів, деякі гідрогелі вивільняють білки протягом більш коротких періодів часу. Якщо укладені в капсулу поліпептиди залишаються в організмі протягом тривалого періоду часу, вони можуть денатурувати або утворювати агрегат у результаті впливу вологи при 37 °C, що у підсумку призводить до втрати біологічної активності та можливих змін в імуногенності. Залежно від задіяного механізму можна розробити раціональні стратегії для стабілізації. Наприклад, якщо виявлено, що механізм агрегації являє собою формування міжмолекулярних S-S зв'язків у результаті тіо-дисульфідного взаємообміну, то стабілізації можна досягти шляхом модифікації сульфгідрильних залишків, ліофілізації з кислотних розчинів, контролю над вмістом вологи, застосування відповідних добавок і розробки специфічних полімерних матричних композицій.

Для одержання гелеподібного складу поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc, складений в рідкій композиції, можна змішати з ефективною кількістю водорозчинного полісахариду або синтетичного полімеру для формування гелю (наприклад, гелеутворюючого засобу), такого як поліетиленгліколь, для формування складу для місцевого нанесення з відповідною в'язкістю. Полісахарид або гелеутворюючий засіб, який можна застосовувати, включає, наприклад, похідні целюлози, такі як етерифіковані похідні целюлози, у тому числі алкілцелюлози, гідроксіалкілцелюлози й алкілгідроксіалкілцелюлози, наприклад, метилцелюлоза, гідроксіетилцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза та гідроксипропілцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза натрію, блок-співполімери POE-POP, полоксамер USP з різним ступенем чистоти, гіалуринову кислоту, поліакрилову кислоту, таку як карбопол 940, крохмаль та фракціонований крохмаль, агар, альгінову кислоту й альгірати, гуміарабік, пулулан, агарозу, карагенан, декстрини, декстрини, фруктани, інулін, маннани, ксилани, арабіни, хітозани, глікогени, глюкани та синтетичні біополімери, а також камеді, такі як ксантанова камедь, гуарова камедь, камедь бобів ріжкового дерева, гуміарабік, трагакантова камедь та камедь карайї, і їх похідні, комбінації та суміші. Відповідно до одного варіанта здійснення даного винаходу гелеутворюючий засіб у даному документі являє собою засіб, який, наприклад, є інертним стосовно біологічних систем, нетоксичним, простим для готування та/або не занадто рідким або густим і не буде дестабілізувати поліпептид IL-22, що міститься в ньому, або химеру IL-22 Fc.

Відповідно до деяких варіантів здійснення за даним винаходом полісахарид являє собою етерифіковану похідну целюлози, відповідно до іншого варіанта здійснення полісахаридом, який добре зазнає визначення, очищення та наведений в USP, наприклад, метилцелюлозою та похідними гідроксіалкілцелюлози, такими як гідроксипропілцелюлоза, гідроксіетилцелюлоза та гідроксипропілметилцелюлоза (всі разом називають целюлозними засобами). Відповідно до деяких варіантів здійснення полісахарид являє собою гідроксіетилметилцелюлозу або гідроксипропілметилцелюлозу.

Придатний для гелеутворення поліетиленгліколь, як правило, являє собою суміш низько- і високомолекулярних поліетиленгліколей для одержання відповідної в'язкості. Наприклад, суміш поліетиленгліколя з молекулярною масою 400-600 з поліетиленгліколем з молекулярною масою 1500 буде ефективна для такої мети при змішуванні у відповідному співвідношенні до одержання пасти.

Термін "водорозчинний", стосовно до полісахаридів і поліетиленгліколей, розуміють як такий, що включає колоїдні розчини та дисперсії. У цілому, розчинність похідних целюлози визначається ступенем заміщення ефірних груп, і стабілізуючі похідні, придатні для даного винаходу, повинні мати достатню кількість таких ефірних груп на ангідроглюкозній ланці в целюлозному ланцюзі для надання похідним водорозчинних властивостей. Зазвичай достатньою є ступінь заміщення ефірних груп, що становить щонайменше 0,35 ефірних груп на ангідроглюкозній ланці. Додатково, похідні целюлози можуть мати форму солей лужних металів, наприклад, солей Li, Na, K або Cs.

Відповідно до деяких варіантів здійснення в гелі використовують метилцелюлозу, наприклад, вона становить приблизно 1-5 % або приблизно 1 %, приблизно 2 %, приблизно 3 %, приблизно 4 % або приблизно 5 % гелю, а поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc є присутнім у кількості, що становить приблизно 50-2000 мкг, 100-2000 мкг або 100-1000 мкг на мл гелю. Відповідно до деяких варіантів здійснення ефективна кількість поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc для загоєння ран шляхом місцевого застосування може становити від приблизно 25 мкг до приблизно 500 мкг, від приблизно 50 мкг до приблизно 300 мкг, від приблизно 100 мкг до приблизно 250 мкг, від приблизно 50 мкг до приблизно 250 мкг, від приблизно 50 мкг до приблизно 150 мкг, приблизно 75 мкг, приблизно 100 мкг, приблизно 125 мкг, приблизно 150 мкг, приблизно 175 мкг, приблизно 200 мкг, приблизно 225 мкг, приблизно 250 мкг, приблизно 300 мкг або приблизно 350 мкг на см<sup>2</sup> площі рани.

Склади, що підлягають застосуванню для введення *in vivo*, зазвичай є стерильними. Стерильності можна легко досягти, наприклад, за допомогою фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани.

Даний винахід відноситься до дозувань для терапевтичних засобів на основі IL-22. Наприклад, залежно від типу та тяжкості захворювання, від приблизно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1-20 мг/кг) поліпептиду є початковим передбачуваним дозуванням для введення суб'єкту, незалежно від того, наприклад, за одне або за декілька роздільних уведень або шляхом безперервної інфузії. Типове добове дозування може варіювати від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від згаданих раніше факторів. Для повторних уведень протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування продовжують доти, поки не відбувається необхідне придушення симптомів захворювання. Проте, придатними можуть бути інші режими дозування. Прогрес такої терапії легко відслідковувати за допомогою традиційних методик і аналізів.

Для попередження або лікування захворювання відповідне дозування поліпептиду за даним винаходом (при застосуванні окремо або в комбінації з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними засобами) буде залежати від типу підлягаючого лікуванню захворювання, типу поліпептиду, тяжкості та плинності захворювання, незалежно від того, чи вводять поліпептид з метою попередження або для терапевтичних цілей, попередньої терапії, історії хвороби та реакції суб'єкта на поліпептид і компетенції лікаря. Поліпептид переважно вводять суб'єкту за один раз або протягом серії лікувальних процедур. Залежно від типу та тяжкості захворювання початкове передбачуване дозування для введення суб'єкту може становити від приблизно 1 мкг/кг до 20 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг – 15 мг/кг) поліпептиду, незалежно від того, наприклад, за одне або за декілька роздільних уведень або шляхом безперервної інфузії. Одне типове добове дозування може варіювати від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від згаданих раніше факторів. Для повторних уведень протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування зазвичай будуть продовжувати доти, поки не відбудеться необхідне придушення симптомів захворювання. Одне ілюстративне дозування поліпептиду може перебувати в діапазоні від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 20 мг/кг. Таким чином, суб'єкту можна ввести одну або декілька доз, що становлять приблизно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 10 мг/кг, 12 мг/кг, 15 мг/кг або 20 мг/кг (або будь-яку їхню комбінацію). Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкту можна ввести приблизно 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 або 20 мг/кг (або будь-яку їхню комбінацію). Такі дози можна вводити з проміжками, наприклад, раз на тиждень, раз на два тижні або раз на три тижні (наприклад, так, щоб суб'єкт одержував від приблизно двох до приблизно двадцяти або, наприклад, приблизно шість доз поліпептиду). Можна вводити початкову більш високу ударну дозу з наступним введенням однієї або декількох більш низьких доз. Ілюстративний режим дозування включає введення початкової ударної дози, що становить приблизно 4 мг/кг, з наступним введенням щотижневої підтримуючої дози, що становить приблизно 2 мг/кг антитіла. Проте, придатними можуть бути інші режими дозування. Прогрес такої терапії легко відслідковувати за допомогою традиційних методик і аналізів.

Сполуки за даним винаходом для попередження або лікування серцево-судинного захворювання або стану, метаболічного синдрому, гострого ендотоксикозу або сепсису або цукрового діабету, як правило, вводять за допомогою внутрішньовенної ін'єкції.

Також можна застосовувати інші способи введення, які включають без обмеження місцеve застосування, парентеральне, таке як внутрішньовенне, підшкірне, внутрішньочеревинне, внутрішньолегеневе, інтраназальне, очне, внутрішньоочне, у склоподібне тіло, внутрішньоосередкове, інтрацереброспинальне, інтраартикулярне, внутрішньосуглобне, підоболонкове, пероральне або інгаляційне введення. Парентеральні інфузії включають

внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревинне або підшкірне введення. Крім того, описані в даному документі сполуки вводять людині відповідно до відомих способів, таких як внутрішньовенне введення у вигляді струминної або безперервної інфузії протягом деякого періоду часу.

5 I. Терапевтичні способи та композиції

У терапевтичних способах можна застосовувати будь-який з наведених у даному документі химерних білків IL-22 Fc, або поліпептидів IL-22, або агоністів IL-22.

а) Запальне захворювання кишечника

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування як лікарський препарат. У відповідності з наступними аспектами даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування при лікуванні IBD, у тому числі UC і CD. Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування в способі лікування. Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування в способі лікування індивідуума з UC або CD, що включає введення індивідуумові ефективної кількості химерного білка IL-22 Fc. Відповідно до одного варіанта здійснення спосіб додатково включає введення індивідуумові ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, наприклад, який описаний нижче. Відповідно до додаткових варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування при підвищенні проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин. Відповідно до деяких певних варіантів здійснення епітеліальна тканина являє собою кишкову епітеліальну тканину. Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування в способі підвищення проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин в індивідуума, який включає введення індивідуумові ефективної кількості химерного білка IL-22 Fc для підвищення проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин. Відповідно до ще одних варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування при лікуванні цукрового діабету, особливо цукрового діабету II типу, загоєнні діабетичних ран, лікуванні метаболічних синдромів й атеросклерозу. Відповідно до деяких варіантів здійснення даний винахід відноситься до химерного білка IL-22 Fc для застосування в способі лікування цукрового діабету, особливо цукрового діабету II типу, загоєнні діабетичних ран, лікуванні метаболічних синдромів й атеросклерозу в індивідуума, який включає введення індивідуумові ефективної кількості химерного білка IL-22 Fc. Див. заявки компанії Genentech з номерами справ у книзі записів PR5586, заявка з серійним №61/800795 під заголовком "Застосування поліпептиду IL-22 для загоєння ран (Using an IL-22 polypeptide for wound healing)", і PR5590, заявка з серійним № 61/801144 під заголовком "Способи лікування серцево-судинних станів і метаболічного синдрому із застосуванням поліпептиду IL-22 (Methods of treating cardiovascular conditions and metabolic syndrome using an IL-22 polypeptide)", обидві подані 15 березня 2013 року. Розкриття обох заявок включені в даний документ за допомогою посилання у повному їхньому об'ємі. "Індивідуум", або "суб'єкт", або "хворий" відповідно до будь-якого з наведених вище варіантів здійснення переважно є людиною.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до застосування поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc у виробництві або одержанні лікарського препарату. Відповідно до одного варіанта здійснення лікарський препарат призначений для лікування IBD і загоєння ран. Відповідно до додаткового варіанта здійснення лікарський препарат призначений для застосування в способі лікування IBD і загоєння ран, який включає введення індивідуумові з IBD ефективної кількості лікарського препарату. Відповідно до одного варіанта здійснення спосіб додатково включає введення індивідуумові ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, наприклад, який описаний нижче. Відповідно до додаткового варіанта здійснення лікарський препарат призначений для придушення запальної реакції в епітеліальних клітинах кишечника. Відповідно до додаткового варіанта здійснення лікарський препарат призначений для застосування в способі підвищення проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин в індивідуума, який включає введення індивідуумові ефективної кількості лікарського препарату для підвищення проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин. "Індивідуум" відповідно до будь-якого з наведених вище варіантів здійснення може бути людиною.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу лікування IBD, у тому числі UC і CD. Відповідно до одного варіанта здійснення спосіб включає введення індивідуумові з IBD ефективної кількості поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc. Відповідно до одного варіанта здійснення спосіб додатково включає введення індивідуумові ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного засобу, який описаний нижче. "Індивідуумом"

відповідно до будь-якого з наведених вище варіантів здійснення може бути людина.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу підвищення проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин в індивідуума. Відповідно до одного варіанта здійснення спосіб включає введення індивідуумові ефективної кількості поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc для підвищення проліферації, диференціювання та/або міграції епітеліальних клітин. Відповідно до одного варіанта здійснення "індивідуумом" є людина.

b) Інші показання до застосування

Даний винахід відноситься до терапевтичних засобів на основі IL-22 від серцево-судинних захворювань і станів, метаболічного синдрому, гострого ендотоксикозу та сепсису і цукрового діабету. Для попередження, лікування або зменшення тяжкості зазначеного захворювання або стану відповідне дозування сполуки за даним винаходом буде залежати від типу підлягаючого лікуванню захворювання або стану, які зазначені вище, тяжкості та плинності захворювання або стану, незалежно від того, чи вводять засіб з метою попередження або для терапевтичних цілей, попередньої терапії, історії хвороби суб'єкта та реакції на сполуку й компетенції лікаря. Сполуку переважно вводять суб'єкту за один раз або протягом серії лікувальних процедур. Переважно, бажано до тестування на людях побудувати криву залежності доза-реакція та визначити фармацевтичну композицію за даним винаходом спочатку *in vitro*, а потім у підходящих тваринних моделях.

Відповідно до одного аспекту даний винахід відноситься до способів лікування серцево-судинного захворювання або порушення, метаболічного синдрому, гострого ендотоксикозу та сепсису й пов'язаного з інсуліном порушення. Відповідно до одного варіанта здійснення спосіб включає введення суб'єкту, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc або агоніста IL-22. Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу затримки або вповільнення прогресування серцево-судинного захворювання або порушення, метаболічного синдрому та пов'язаного з інсуліном порушення. Відповідно до одного варіанта здійснення спосіб включає введення суб'єкту з діагнозом захворювання, стану або порушення ефективної кількості поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc або агоніста IL-22. Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до способу попередження прояву ознак серцево-судинного захворювання або порушення та пов'язаного з інсуліном порушення. Відповідно до одного варіанта здійснення спосіб включає введення ефективної кількості поліпептиду IL-22, химерного білка IL-22 Fc або агоніста IL-22 суб'єкту, підданому ризику захворювання, стану або порушення, причому поліпептид IL-22, химерний білок IL-22 Fc або агоніст IL-22 ефективний проти розвитку ознак захворювання, стану або порушення.

Серцево-судинні захворювання та стани

Відповідно до одного аспекту поліпептиди IL-22, химерні білки IL-22 Fc й агоністи IL-22 забезпечують попереджувальний або профілактичний ефект проти розвитку або прогресування клінічних, і/або гістологічних, і/або біохімічних, і/або патологічних ознак (у тому числі як симптомів, так і об'єктивних ознак) серцево-судинних захворювань або станів у суб'єкта. Відповідно до одного варіанта здійснення захворювання або стан являє собою атеросклероз. Відповідно до одного варіанта здійснення ознаки включають формування атеросклеротичних бляшок і/або судинне запалення. Відповідно до іншого варіанта здійснення суб'єкт піддається ризику серцево-судинного захворювання. У цілому, підданий ризику суб'єкт буде таким, у якого вже було серцево-судинне захворювання або стан, які описані в даному документі, або буде мати генетичну схильність до серцево-судинного захворювання або стану.

Ефективність лікування серцево-судинних захворювань та станів можна виміряти за допомогою різних оцінок, які широко використовуються при визначенні серцево-судинних захворювань. Наприклад, можна оцінити здоров'я серцево-судинної системи. Здоров'я серцево-судинної системи можна визначити за допомогою без обмеження, наприклад, аналізів крові (наприклад, загального холестерину, LDL-C, HDL-C, тригліциду, C-реактивного білка, фібриногену, гомоцистеїну, інсуліну натще, феритину, ліпопротеїну, LPS), кров'яного тиску, аускультатії, електрокардіограми, кардіологічного стрес-тесту, візуалізації серця (наприклад, коронарної катетеризації, ехокардіограми, внутрішньосудинного ультразвукового дослідження, позитронно-емісійної томографії, комп'ютерної томографічної ангіографії та магнітно-резонансної візуалізації).

Метаболічний синдром

Відповідно до одного аспекту поліпептиди IL-22, химерні білки IL-22 Fc й агоністи IL-22 забезпечують терапевтичний, попереджувальний або профілактичний ефект проти розвитку або прогресування клінічних, і/або гістологічних, і/або біохімічних, і/або патологічних ознак (у тому

числі як симптомів, так і об'єктивних ознак) метаболічного синдрому (або метаболічного порушення або захворювання) у суб'єкта. Відповідно до одного або декількох варіантів здійснення суб'єкт піддається ризику метаболічного синдрому.

Ефективність лікування метаболічного синдрому можна змінити за допомогою різних оцінок, які широко використовуються при визначенні метаболічного синдрому. Наприклад, можна виміряти ожиріння. В якості додаткового прикладу можна виміряти гіперглікемію, дисліпідемію, резистентність до інсуліну, хронічне запалення жирової тканини та/або гіпертонію. Можна виміряти зменшення рівнів одного або декількох з С-реактивного білка, IL-6, LPS й інгібітора активатора плазміногена 1. Такі вимірювання можна проводити за допомогою будь-яких добре відомих з рівня техніки способів.

Пов'язані з інсуліном порушення

Для пов'язаних з інсуліном порушень термін "лікування" відноситься як до терапевтичного лікування, так і до профілактичних або запобіжних заходів відносно порушення, причому метою є попередження або вповільнення (зменшення) цільового патологічного стану або порушення. Суб'єкти, що потребують лікування, включають суб'єктів, що вже мають пов'язане з інсуліном порушення, а також суб'єктів, схильних до такого порушення, або суб'єктів, у яких необхідно попередити таке порушення.

Відповідно до одного аспекту поліпептиди IL-22, химерні білки IL-22 Fc й агоністи IL-22 забезпечують попереджуючий або профілактичний ефект проти розвитку або прогресування клінічних, і/або гістологічних, і/або біохімічних, і/або патологічних ознак (у тому числі як симптомів, так і об'єктивних ознак) пов'язаного з інсуліном порушення в суб'єкта. Відповідно до одного варіанта здійснення порушення являє собою цукровий діабет I типу, цукровий діабет II типу або гестаційний цукровий діабет. Відповідно до одного варіанта здійснення патологія або патологічні ознаки включають одне або декілька з наступного: малого вироблення інсуліну підшлунковою залозою або повної її відсутності (наприклад, острівцевими клітинами), резистентності до інсуліну та гіперглікемії. Відповідно до іншого варіанта здійснення суб'єкт піддається ризику пов'язаного з інсуліном порушення. У цілому, підданому ризику суб'єкт має генетичну схильність до пов'язаного з інсуліном порушення, зазнав впливу вірусу, який запускає аутоімунне руйнування острівцевих клітин (наприклад, вірусу Епштейна-Барра, вірусу Коксакі, вірусу епідемічного паротиту або цитомегаловірусу), страждає від ожиріння, схильний до діабету (перевищуючі нормальні рівні цукру в крові) або має гестаційний цукровий діабет.

Ефективність лікування пов'язаного з інсуліном порушення можна змінити за допомогою різних оцінок, які широко використовуються при визначенні таких порушень. Наприклад, цукровий діабет як I типу, так і II типу можна визначити за допомогою одного або декількох з наступних: тесту на глікозильований гемоглобін (A1C), тесту на звичайний рівень цукру в крові та тесту на рівень цукру в крові натще. I тип також можна визначити за допомогою тестування на аутоімунні антитіла в крові та/або на кетони в сечі. II тип також можна визначити за допомогою тестування на толерантність до пероральної глюкози.

Гострий ендотоксикоз і сепсис

Відповідно до одного аспекту поліпептиди IL-22, химерні білки IL-22 Fc й агоністи IL-22 забезпечують терапевтичний, попереджуючий або профілактичний ефект проти розвитку або прогресування клінічних, і/або гістологічних, і/або біохімічних, і/або патологічних ознак (у тому числі як симптомів, так і об'єктивних ознак) гострого ендотоксикозу, сепсису або і того, і іншого в суб'єкта. Відповідно до одного або декількох варіантів здійснення суб'єкт піддається ризику гострого ендотоксикозу, сепсису або і того, і іншого.

Ефективність лікування гострого ендотоксикозу, сепсису або і того, і іншого можна виміряти за допомогою різних оцінок, які широко використовуються при визначенні гострого ендотоксикозу, сепсису або і того, і іншого. Наприклад, можна виміряти рівні LPS або маркерів запалення. Такі вимірювання можна проводити за допомогою будь-яких добре відомих з рівня техніки способів.

Загоєння ран

Існує ряд способів вимірювання загоєння ран. Найчастіше одержують зображення для розрахунків лінійних розмірів, периметра та площі. В NIH є вільна програма, Image J, яка дозволяє проводити вимірювання площі ран за зображенням. Остаточний прогноз із загоєння можна одержати шляхом екстраполяції зі значень швидкості початкового загоєння за результатами зсуву контуру в напрямку до центру. Його роблять за допомогою ряду математичних рівнянь, найпоширенішим з яких є модифіковане рівняння Гільмана. На додаток до візуального огляду вимірювання загоєння ран можна також доповнити спектроскопічними способами або MRI. Див., наприклад, Dargaville et al., Biosensors Bioelectronics, 2013, 41:30-42, Tan et al., 2007, British J. Radiol. 80:939-48. Якщо загоєння є повільним/ неповноцінним, то можна

взяти біопсії країв рани для виключення або визначення інфекції та злоякісного новоутворення. Відповідно до деяких варіантів здійснення прискорення або поліпшення загоєння ран можна оцінити шляхом порівняння закриття ран в IL-22-оброблених і контрольних ран. Відповідно до деяких варіантів здійснення прискорення або поліпшення загоєння ран щонайменше на 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 % швидше або краще, ніж у контролі.

Відповідно до деякого аспекту даний винахід відноситься до способів стимуляції/ прискорення/ поліпшення загоєння ран з активною інфекцією, мікробіологічним забрудненням або колонізацією в рані або без них. Поліпептиди IL-22, химерні білки IL-22 Fc або агоністи IL-22 можна застосовувати для лікування інфікованих ран або стимуляції/ прискорення/ поліпшення загоєння інфікованих ран. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептиди IL-22, химерні білки IL-22 Fc або агоністи IL-22 можна застосовувати для лікування ран або стимуляції/ прискорення/ поліпшення загоєння ран при інфекції. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептиди IL-22, химерні білки IL-22 Fc або агоністи IL-22 можна застосовувати для лікування ран або стимуляції/ прискорення/ поліпшення загоєння ран при мікробіологічному забрудненні або колонізації з ризиком інфекції. Відповідно до додаткових варіантів здійснення хворий, що потребує в лікуванні для загоєння рани, може бути хворим цукровим діабетом. Таким чином, відповідно до деяких варіантів здійснення рана являє собою діабетичну рану, наприклад, виразку діабетичної стопи. Відповідно до деяких додаткових варіантів здійснення рана являє собою інфіковану діабетичну рану, наприклад, інфіковану виразку діабетичної стопи.

Відповідно до іншого аспекту даний винахід відноситься до фармацевтичних складів, що містять запропоновані в даному документі поліпептид IL-22, химерний білок IL-22 Fc або агоніст IL-22, наприклад, для застосування у будь-якому з описаних вище терапевтичних способів. Відповідно до одного варіанта здійснення фармацевтичний склад містить запропоновані в даному документі поліпептид IL-22, химерний білок IL-22 Fc або агоніст IL-22 і фармацевтично прийнятний носій. Відповідно до іншого варіанта здійснення фармацевтичний склад містить запропоновані в даному документі поліпептид IL-22, химерний білок IL-22 Fc або агоніст IL-22 і щонайменше один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, які описані нижче.

Химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом можна застосовувати або окремо, або в комбінації з іншими засобами при терапії. Наприклад, поліпептид IL-22, химерний білок IL-22 Fc або агоніст IL-22 за даним винаходом можна одночасно застосовувати щонайменше з одним додатковим терапевтичним засобом. Відповідно до деяких варіантів здійснення додатковий терапевтичний засіб являє собою імунодепресант, який зменшує запальну реакцію, включаючи без обмеження метотрексат, інгібітор TNF, антагоніст TNF, месалазин, стероїд, дексаметазон і азатіоприн і їх комбінацію. Підходящими додатковими терапевтичними засобами, які зменшують запальну реакцію, включають без обмеження 5-аміносаліцилову кислоту (5-ASA), меркаптопурин (також називаний 6-меркаптопурин або 6-MP) або їх комбінацію. Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL22 або химеру IL-22 Fc можна одночасно застосовувати з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами, які зменшують запальну реакцію (наприклад, 5-ASA, 6-MP або антагоністом TNF), для лікування IBD. Відповідно до інших певних варіантів здійснення поліпептид IL22 або химеру IL-22 Fc можна одночасно застосовувати з антагоністом інтегрину, таким як етролізумаб, для лікування IBD. Відповідно до одного варіанта здійснення поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc застосовують у комбінації з агоністом IL-22.

Для прискорення загоєння хронічних ран, наприклад, для лікування виразки діабетичної стопи, застосування поліпептиду IL-22 або його фрагментів або варіантів, химерні білки IL-22 Fc або агоністи IL-22 можна комбінувати з одним або декількома додатковими засобами для загоєння ран. Підходящі додаткові засоби для загоєння ран включають без обмеження фактори росту (наприклад, EGF, FGF, IGF, PDGF, TGF і VEGF), нейрональний ростовий фактор (NGF), фактори ангіогенезу (наприклад, HGF, TNF- $\alpha$ , ангіогенін, IL-8, ангіопоетини 1 і 2, Tie-2, інтегрин  $\alpha 5$ , матричні металопротеїнази, оксид азоту, COX-2), членів сімейства тромбоцитарних факторів росту (PDGF) (наприклад, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C і PDGF-D), членів сімейства інсуліноподібних факторів росту (IGF) (наприклад, IGF-I, IGF-II), членів сімейства трансформуючих факторів росту (TGF) (наприклад, TGF- $\alpha$  TGF- $\beta$ ) й анаболічний кисень (вакуумна терапія). Відповідно до деяких варіантів здійснення поліпептид IL-22 або химеру IL-22 Fc можна одночасно застосовувати з одним або декількома додатковими описаними в даному документі засобами для загоєння ран і/або одним або декількома протибактеріальними засобами або антибіотиками, що підходять для використання при місцевому застосуванні. Див. WO2006/138468, включений у даний документ за допомогою посилання у повному його об'ємі. Відповідно до таких варіантів здійснення антибіотиком може бути сірковмісний антибіотик, включаючи без обмеження сульфадіазин срібла, тобто сильвадин. Одночасно застосовувані



один або декілька додаткових засобів можна застосовувати паралельно, поперемінно або послідовно з поліпептидом IL-22, химерним білком IL-22 або агоністом IL22.

Відповідно до додаткових ілюстративних варіантів здійснення, якщо метою є попередження або лікування серцево-судинних захворювань або станів або метаболічного синдрому, то введення поліпептиду IL-22 або його фрагментів або варіантів, химерних білків IL-22 Fc або агоністів IL-22 можна комбінувати або доповнювати введенням знижуючих вміст холестерину засобів, таких як статини (наприклад, ловастин, розувастатин, флувастатин, аторвастатин, правастатин і симвастатин), смоли, що зв'язують жовчні кислоти (коlestипол, холестирамінсахароза та колесевелам), езетиміб або комбінація езетимібу та симвастатину; антитромбоцитарних засобів, таких як інгібітори циклооксигенази (аспірин), інгібітори аденозиндифосфатних (ADP) рецепторів (клопідогрель, прасугрел, тікагрелор, тіклопідин), інгібітори фосфодіестерази (цилостазол), інгібітори глікопротеїну IIb/IIIa (абциксимаб, ептифібатид, тирофібан), інгібітори зворотного захоплення аденозину (дипіридамо), інгібітори тромбоксану (інгібітори тромбоксансинтази, антагоністи тромбоксанових рецепторів, терутробан); бета-блокаторів, таких як альпренолол, буциндол, картеолол, карведилол, лабеталол, надолол, окспренолол, пенбутолол, піндолол, пропранолол, соталол, тимолол, кора евкомії, ацебутолол, атенолол, бетаксол, бізопролол, целіпролол, есмолол, метопролол, небіволол, бутаксамін, ICI-118,551 і SR 59230A; інгібіторів ангіотензин-перетворюючого ферменту (ACE), таких як каптоприл, зофеноприл, дикарбоксилат-вмісні засоби (еналаприл, раміприл, хінаприл, периндоприл, лізиноприл, беназеприл, імідаприл, зофеноприл), фосфат- вмісні засоби (фозиноприл), касокініни, лактокініни, лактотрипептиди (Val-Pro-Pro і Ile-Pro-Pro, вироблювані пробіотичним *Lactobacillus helveticus*, або отриманий з них казеїн); блокаторів кальцієвих каналів, таких як дигідропіридини (наприклад, амлодипін, аранідипін, азелнідипін, барнідипін, бенідипін, цилнідипін, клевідипін, ісрадіпін, ефонідипін, фелодипін, лацидипін, лерканідипін, манідипін, нікардипін, ніфедипін, нілвадипін, німодипін, нісолдипін, нітрендипін пранідипін), фенілалкіламіни (наприклад, верапаміл), бензотіазепіни (наприклад, дилтіазем), мібефрадил, бепридил, флуспірилен і фенділін; діуретиків, таких як сильно діючі стельові/ петлеві діуретики (наприклад, фуросемід, етакринова кислота, торасемід і буметанід), тіазиди (наприклад, гідрохлоротіазидна кислота), інгібітори карбоангідрази (наприклад, ацетазоламід і метазоламід), помірні калієві діуретики (наприклад, антагоністи альдостерону: спіронолактон, і блокатори епітеліальних натрієвих каналів: амілорид і триамтерен), і діуретики, які знижують ниркову екскрецію кальцію, і фармацевтично прийнятних солей, кислот або похідних будь-яких із вищеперерахованих.

Для пов'язаних з інсуліном порушень або метаболічного синдрому введення поліпептиду IL-22 або його фрагментів або варіантів або химерного білка IL-22 Fc або агоністів IL-22 можна комбінувати з або доповнювати введенням різних терапевтичних засобів. У випадку цукрового діабету I типу (інсулін-залежного цукрового діабету або IDDM) описані в даному документі поліпептид IL-22, химерний білок Fc або агоніст комбінують з одним або декількома з регулярної інсулін-замісної терапії (включаючи швидкодіючий і довгодіючий інсулін), імуносупресивного лікування, трансплантації островців і терапії стовбурними клітинами. Відповідно до одного варіанта здійснення регулярна інсулін-замісна терапія включає без обмеження регулярний інсулін (наприклад, хумілін Р, новолін Р), інсулін ізофан (наприклад, хумілін Н, новолін Н), інсулін лізпро (наприклад, Humalog), інсулін аспарт (наприклад, новолог), інсулін гларгін (наприклад, лантус) й інсулін детемір (наприклад, левемір). Відповідно до інших варіантів здійснення, інсулін-замісна терапія додатково включає прамлінтид (Symlin).

У випадку цукрового діабету II типу (інсулін-незалежного цукрового діабету або NIDDM) або метаболічного синдрому описані в даному документі поліпептид IL-22, химерний білок Fc і агоніст можна комбінувати з одним або декількома з інсулін- замісної терапії (яка розглянута вище), засіб, що знижує вироблення глюкози печінкою, засіб, що стимулює вироблення секрету підшлункової залози та вивільнення інсуліну, засіб, що блокує ферментативне розщеплення вуглеводів або підвищує чутливість до інсуліну. Відповідно до одного варіанта здійснення засобом, що знижує вироблення глюкози, є метформін (наприклад, Glucophage, Glumetza). Відповідно до іншого варіанта здійснення засобом, що стимулює вироблення секрету підшлункової залози та вивільнення інсуліну, є гліпізид (наприклад, Glucotrol, Glucotrol XL), глібурид (наприклад, DiaBeta, Glynase) і глімепірид (наприклад, Amaryl). Відповідно до ще одного варіанта здійснення засобом, що блокує ферментативне розщеплення вуглеводів або підвищує чутливість до інсуліну, є піоглітазон (наприклад, Actos). Відповідно до іншого варіанта здійснення поліпептид IL-22, химерний білок Fc і агоніст можна комбінувати з одним з наступних замісників метформіну: ситагліптіном (наприклад, Januvia), саксагліптіном (наприклад, Onglyza), репаглінідом (наприклад, Prandin) і натеглінідом (наприклад, Starlix), ексенатидом

(наприклад, Byetta) і ліпаглутидом (наприклад, Victoza). Відповідно до іншого варіанта здійснення поліпептид IL-22, химерний білок Fc і агоніст можна комбінувати з гіпоглікемічним засобом, наприклад, сульфонілсечовинами.

У випадку гестаційного цукрового діабету або метаболічного синдрому описані в даному документі поліпептид IL-22, химеру Fc і агоніст комбінують з пероральним лікарським препаратом для контролю рівня цукру в крові. Відповідно до одного варіанта здійснення лікарським препаратом є глібурид.

Комбінована терапія може забезпечувати "синергію" та виявляти "синергічний ефект", тобто ефект, що досягається при спільному застосуванні активних інгредієнтів більше, ніж сума ефектів, що є результатом роздільного застосування сполук. Синергічного ефекту можна досягти, коли активні інгредієнти: (1) спільно складають в суміш й одночасно вводять або доставляють у комбінованому складі з однократним дозуванням; (2) доставляють шляхом із чергуванням або паралельно у вигляді окремих складів; або (3) за деяким іншим режимом. При доставці в терапії, що чергується, синергічного ефекту можна досягти при послідовному введенні або доставці сполук, наприклад, за допомогою різних ін'єкцій в окремих шприцах. У цілому, при терапії, що чергується, ефективне дозування кожного активного інгредієнта вводять послідовно, тобто періодично, у той час як при комбінованій терапії ефективні дозування двох або більше активних інгредієнтів вводять спільно.

Такі вищезгадані комбіновані терапії охоплюють комбіноване введення (коли два або більше терапевтичних засобів включені в один склад або в роздільні склади) і роздільне введення, у випадку якого введення поліпептиду IL-22 або химерного білка IL-22 Fc за даним винаходом може відбуватися до введення, одночасно з введенням і/або після введення додаткового терапевтичного засобу або додаткових терапевтичних засобів. Відповідно до одного варіанта здійснення введення химерного білка IL-22 Fc і введення додаткового терапевтичного засобу відбувається в межах приблизно одного місяця, або в межах приблизно одного, двох або трьох тижнів, або в межах приблизно одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести днів один від одного.

Поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом (і будь-який додатковий терапевтичний засіб) можна застосовувати будь-яким підходящим способом, включаючи парентеральне, внутрішньолегеве введення, місцеве застосування, і інтраназальне введення, і, при необхідності місцевого лікування, внутрішньоосередкове введення. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревинне або підшкірне введення. Дозування можна здійснювати будь-яким підходящим шляхом, наприклад, шляхом ін'єкцій, таких як внутрішньовенна або підшкірна ін'єкції, у залежності почасти від того, чи є введення недовгим або тривалим. У даному документі передбачені різні схеми дозування, включаючи без обмеження однократне введення або багаторазові введення в різні моменти часу, струминне введення й імпульсну ін'єкцію.

Поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом будуть складати в суміш, дозувати та вводити таким чином, щоб це відповідало вимогам належної медичної практики. Розглянуті в даному контексті фактори включають конкретне порушення, що зазнає лікування, конкретного ссавця, що зазнає лікування, клінічний стан окремого хворого, причину порушення, місце доставки засобу, спосіб введення, схему введення й інші фактори, відомі практикуючим лікарям. Немає необхідності в тому, щоб поліпептид IL-22 або химерний білок IL-22 Fc складати в суміш із одним або декількома засобами, які одночасно застосовують для попередження або лікування розглянутого порушення, але необов'язково це можна зробити. Ефективна кількість таких інших засобів залежить від кількості химерного білка, що присутній в складі, типу порушення або лікування й інших розглянутих вище факторів. Їх зазвичай застосовують в однакових дозуваннях і шляхами введення, які описані в даному документі, або у приблизно від 1 до 99 % дозувань, описаних у даному документі, або у будь-якому дозуванні або будь-яким шляхом, які емпірично/клінічно визначені як відповідні.

Для попередження або лікування захворювання відповідне дозування химерного білка IL-22 Fc за даним винаходом (при застосуванні окремо або в комбінації з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними засобами) буде залежати від типу підлягаючого лікуванню захворювання, типу Fc ділянки, тяжкості та плинності захворювання, незалежно від того, чи вводять химерний білок з метою попередження або для терапевтичних цілей, попередньої терапії, історії хвороби та реакції хворого на химерний білок IL-22 Fc і компетенції лікаря. Химерний білок IL-22 Fc переважно вводять хворому за один раз або протягом серії лікувальних процедур. Залежно від типу та тяжкості захворювання, початкове передбачуване дозування для введення суб'єкту може становити від приблизно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, 0,1 мг/кг – 10 мг/кг) або приблизно 0,1 мкг/кг – 1,5 мг/кг (наприклад, 0,01 мг/кг – 1 мг/кг) химерного білка IL-22 Fc,

незалежно від того, наприклад, за одне або за декілька роздільних введень або шляхом безперервної інфузії. Одне типове добове дозування може варіювати від приблизно 1 мг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від згаданих раніше факторів. Для повторних введень протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування зазвичай будуть продовжувати доти, поки не відбудеться необхідне придушення симптомів захворювання. Одне ілюстративне дозування химерного білка IL-22 Fc може перебувати в діапазоні від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 10 мг/кг. Деякі інші дозування включають діапазон від приблизно 0,01 мг/кг до приблизно 10 мг/кг, від приблизно 0,02 мг/кг до приблизно 10 мг/кг і від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 10 мг/кг. Таким чином, хворому можна вводити одну або декілька доз, що становлять приблизно 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 або 10 мг/кг (або будь-яку їхню комбінацію). Для місцевого загоєння ран на хворому можна застосовувати одну або декілька доз, що становлять від приблизно 0,001 мг/см<sup>2</sup> до приблизно 10 мг/см<sup>2</sup> площі рани, від приблизно 0,05 мг/см<sup>2</sup> до приблизно 5 мг/см<sup>2</sup> площі рани, від приблизно 0,01 мг/см<sup>2</sup> до приблизно 1 мг/см<sup>2</sup> площі рани, від приблизно 0,05 мг/см<sup>2</sup> до приблизно 0,5 мг/см<sup>2</sup> площі рани, від приблизно 0,01 мг/см<sup>2</sup> до приблизно 0,5 мг/см<sup>2</sup> площі рани, від приблизно 0,05 мг/см<sup>2</sup> до приблизно 0,2 мг/см<sup>2</sup> площі рани або від приблизно 0,1 мг/см<sup>2</sup> до приблизно 0,5 мг/см<sup>2</sup> площі рани (або будь-яку їхню комбінацію). Відповідно до деяких варіантів здійснення на хворому можна застосовувати одну або декілька доз, що становлять приблизно 0,01 мг/см<sup>2</sup>, 0,02 мг/см<sup>2</sup>, 0,03 мг/см<sup>2</sup>, 0,04 мг/см<sup>2</sup>, 0,05 мг/см<sup>2</sup>, 0,06 мг/см<sup>2</sup>, 0,07 мг/см<sup>2</sup>, 0,08 мг/см<sup>2</sup>, 0,09 мг/см<sup>2</sup>, 0,1 мг/см<sup>2</sup>, 0,15 мг/см<sup>2</sup>, 0,2 мг/см<sup>2</sup>, 0,25 мг/см<sup>2</sup>, 0,3 мг/см<sup>2</sup>, 0,4 мг/см<sup>2</sup> або 0,5 мг/см<sup>2</sup> площі рани. Такі дози можна вводити з проміжками, наприклад, раз на тиждень, раз на два тижні або раз на три тижні (наприклад, так, щоб хворий одержував від приблизно двох до приблизно двадцяти або, наприклад, приблизно шість доз химерного білка IL-22 Fc). Можна вводити початкову більш високу ударну дозу з наступним введенням однієї або декількох більш низьких доз. Проте, придатними можуть бути інші режими дозування. Прогрес такої терапії легко відслідковувати за допомогою традиційних методик і аналізів. Схожі діапазони дозувань можна застосовувати і до поліпептиду IL-22.

Зрозуміло, що будь-який з описаних вище складів або терапевтичних способів можна здійснити за допомогою кон'югату за даним винаходом замість химерного білка IL-22 Fc або на додаток до нього.

#### J. Вироби

Відповідно до іншого аспекту за даним винаходом даний винахід відноситься до виробу, що містить матеріали, придатні для лікування, попередження та/або діагностики описаних вище порушень. Виріб включає ємність й етикетку або листок-вкладиш на ємності або асоційовані з ємністю. Підходящі ємності включають, наприклад, сулії, ампули, шприци, пакет для розчинів для внутрішньовенного вливання тощо. Ємності можуть бути сформовані з ряду матеріалів, таких як скло або пластик. Ємності містять композицію, яка сама по собі або в комбінації з іншою композицією є ефективною для лікування, попередження та/або діагностики стану, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, ємність може являти собою пакет для розчину для внутрішньовенного вливання або ампулу з пробкою, яку можна проколоти голкою для підшкірної ін'єкції). Щонайменше одним активним засобом у композиції є химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом. На етикетці або листку-вкладиші зазначено, що композицію застосовують для лікування переважного стану. Більше того, виріб може включати (а) першу ємність з композицією, що міститься в ній, причому композиція містить химерний білок IL-22 Fc за даним винаходом; і (b) другу ємність з композицією, що міститься в ній, причому композиція містить додатково цитотоксичний або діючий іншим способом терапевтичний засіб. Виріб відповідно до такого варіанта здійснення за даним винаходом може додатково містити листок-вкладиш, на якому зазначено, що композиції можна застосовувати для лікування конкретного стану. Альтернативно або додатково, виріб може додатково включати другу (або третю) ємність, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрази. Він може додатково включати інші матеріали, необхідні з комерційної або споживчої точки зору, у тому числі інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприци.

Зрозуміло, що будь-який з описаних вище виробів може включати кон'югат за даним винаходом замість химерного білка IL-22 Fc або на додаток до нього.

#### K. Скринінгові аналізи та тваринні моделі

Як проілюстровано в розділі Приклади, IL-22, химерний білок IL-22 Fc й агоністи IL-22 можна оцінити в ряді клітинних аналізів і тваринних моделях IBD, серцево-судинних захворювань або

станів і метаболічного синдрому.

Рекомбінантні (трансгенні) тваринні моделі можна сконструювати шляхом введення кодуючої частини генів, що представляють інтерес, у геном тварин, що представляють інтерес, за допомогою стандартних методик одержання трансгенних тварин. Тварини, які можуть  
5 служити об'єктом для трансгенної маніпуляції, включають без обмеження мишей, пацюків, кроликів, морських свинок, овець, кіз, свиней і приматів, за винятком людини, наприклад, павіанів, шимпанзе й інших мавп. Відомі з рівня техніки методики введення трансгена таким тваринам включають мікроін'єкцію у пронуклеус (Horpe and Wanger, патент США № 4873191); опосередкований ретровірусом перенос генів у зародкові лінії (наприклад, Van der Putten et al.,  
10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); спрямований вплив на ген в ембріональних стовбурних клітинах (Thompson et al., Cell 56, 313-321 [1989]); електропорацію зародків (Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814 [1983]); спермій-опосередкований перенос генів (Lavitrano et al., Cell 57, 717-73 [1989]). Огляд, див., наприклад, у патенті США №4736866.

У контексті даного винаходу трансгенні тварини включають тварин, які несуть трансген  
15 тільки в частині своїх клітин ("мозаїчні тварини"). Трансген можна вмонтувати або в якості одного трансгена або в конкатемерах, наприклад, у тандемах "голова до голови" або "голова до хвоста". Вибірче введення трансгена в конкретний тип клітин також можна здійснити за допомогою, наприклад, методики, описаної в Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 623-636 (1992).

Експресію трансгена у трансгенних тварин можна відслідковувати за допомогою стандартних методик. Наприклад, для перевірки вбудовування трансгена можна застосовувати саузєрн-блоттинг або ПЛР-ампліфікацію. Потім можна проаналізувати рівень експресії іРНК за допомогою таких методик, як гібридизація *in situ*, нозєрн-блоттинг, ПЛР або імуноцитометрія.

Тварин можна додатково досліджувати відносно об'єктивних ознак відповідної патології, такої як патологія серцево-судинного захворювання, наприклад, за допомогою гістологічного дослідження та/або візуалізації або за допомогою ультразвукового аналізу для визначення об'єму атеросклеротичних бляшок і функції судин (див. Приклади нижче). Також можна провести експерименти з блокадою, в яких трансгенних тварин обробляють ІЛ-22, химерним білком ІЛ-22 Fc або передбачуваним агоністом для визначення масштабів ефектів на  
30 формування атеросклеротичних бляшок, у тому числі розмір, кількість та ступінь формування бляшок. У таких експериментах тварині вводять блокувальні антитіла, які зв'язуються з поліпептидом за даним винаходом, і відслідковують біологічний ефект, що представляє інтерес.

Альтернативно, можна сконструювати "нокаутних" тварин, які мають дефектний або змінений ген, що кодує ІЛ-22, у результаті гомологічної рекомбінації між ендегенним геном, що кодує поліпептид ІЛ-22, і зміненою геномною ДНК, що кодує такий самий поліпептид, який введений в ембріональну клітину тварини. Наприклад, для клонування геномної ДНК, що кодує ІЛ-22, можна застосовувати кДНК, що кодує ІЛ-22, відповідно до загальноприйнятих методик. Частину геномної ДНК, що кодує ІЛ-22, можна вилучити або замінити іншим геном, таким як ген, що кодує селектований маркер, який можна використовувати для відстеження вбудовування. Як  
40 правило, у вектор включено декілька тисяч основ незмінної фланкуючої ДНК (на обох 5' і 3' кінцях) [див., наприклад, Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987) для опису векторів для гомологічної рекомбінації]. Вектор вводять у лінію ембріональних стовбурних клітин (наприклад, за допомогою електропорації) і відбирають клітини, в яких уведена ДНК гомологічно рекомбінувала з ендегенною ДНК [див., наприклад, Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. Відібрані клітини потім вводять у бластоцисту тварини (наприклад, миші або пацюка) для формування агрегаційних химер [див., наприклад, Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Химерні зародки потім імплантують у підходящу псевдовагітну сурогатну самку тварини та зародок у результаті розвивається в "нокаутну" тварину. Потомство, що несе піддану гомологічній рекомбінації ДНК у  
50 своїх зародкових клітинах, можна виявити за допомогою стандартних методик і використовувати для розведення тварин, у яких усі клітини тварини містять піддану гомологічній рекомбінації ДНК. Нокаутних тварин можна охарактеризувати, наприклад, за їхньою здатністю протистояти певним патологічним станам і за розвитком в них патологічних станів у зв'язку з відсутністю поліпептиду ІЛ-22.

Таким чином, біологічну активність ІЛ-22 або його потенційних агоністів можна додатково досліджувати на нокаутних за мишачим ІЛ-22 мишах.

Вважають, що наведений далі письмовий опис є достатнім для того, щоб фахівець у даній області техніки зміг здійснити на практиці даний винахід. Наведені далі приклади запропоновані лише в ілюстративних цілях і не мають на увазі як яким-небудь чином обмежуючі об'єм даного винаходу. Фактично, з наведеного вище опису фахівцям у даній області техніки будуть

очевидні різні модифікації даного винаходу, крім показаних і описаних у даному документі, і всі вони підпадають під об'єм прикладеної формули винаходу.

#### Приклади

Далі наведені приклади способів і композицій за даним винаходом. Зрозуміло, що, беручи до уваги наведений вище загальний опис, на практиці можна реалізувати різні інші варіанти здійснення, і мається на увазі, що приклади не обмежують об'єм формули винаходу.

#### Приклад 1

Клонування, експресія й очищення химерного білка IL-22 Fc

У наведених далі експериментах можна застосовувати загальноприйняті методики молекулярного клонування й очищення білків.

#### i. Клонування

Повнорозмірний людський IL-22 клонували з бібліотеки кДНК товстої кишки людини (Genentech). Для такого експерименту створювали конструкції, що експресують гібридний білок людський IgG1 або IgG4 IL-22Fc, за допомогою методики ПЛР із перекриваючими праймерами із застосуванням наступних праймерів: прямий праймер для IgG1 гібриду з IL-22Fc: TTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCA TCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTTCAGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGC (SEQ ID NO:52), зворотній праймер для IgG1 гібриду з IL-22 Fc: AGGTCGACTCATTTACCCGGA GACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:53), прямий праймер для IgG4 гібриду з IL-22 Fc: TTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTT TTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTTCAGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGC (SEQ ID NO:54), зворотній праймер IgG4 гібриду з IL-22 Fc: AGGTCGACTTATT TACCCAGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:55). ПЛР-продукти клонували у вектори експресії pRK5.sm (Genentech). Лідерну послідовність (або сигнальний пептид) відщеплювали в клітині, і зрілий гібрид IL-22 Fc не містив лідерну послідовність. Клони, які несли штучні лінкери, клонували з праймерами, що містили лінкерні послідовності. Додатково вводили мутацію N297G за допомогою мутагенезу за допомогою ПЛР із застосуванням наступних праймерів: прямий праймер IgG1 N297G: GCG GGA GGA GCA GTA CGG AAG CAC GTA CCG TGT GG (SEQ ID NO:56), зворотній праймер IgG1 N297G: CCA CAC GGT ACG TGC TTC CGT ACT GCT CCT CCC GC (SEQ ID NO:57), прямий праймер IgG4 N297G: ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC GGA AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC (SEQ ID NO:58), і зворотній праймер IgG4 N297G: GAC GCT GAC CAC ACG GTA CGT GCT TCC GAA CTG CTC CTC CCG CGG CTT TGT (SEQ ID NO:59). Послідовності всіх конструкцій IL-22Fc підтверджували за допомогою секвенування ДНК.

#### ii. Культивування клітин

Клітини CHO вирощували в суспензії з поділом культур 2 рази на тиждень на  $0,3 \times 10^6$  клітин/мл в інкубаторі, установленому на  $37^\circ\text{C}$  і 5 %  $\text{CO}_2$ .

#### iii. Трансфекція химерного білка IL-22 Fc у клітини CHO й експресія білка

Клітини CHO висіювали в кількості  $1,23 \times 10^6$  клітин/мл в 720 мл культурального середовища. Трансфекційний комплекс (1,6 мл PEI+800 мкг ДНК в 80 мл безсироваткового середовища) інкубували протягом 10 хвилин перед додаванням до клітин. Культуру інкубували при  $33^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , протягом 24 годин. Після додаткового культивування протягом 14 днів надосадову рідину культури збирали за допомогою центрифугування. Перехідне CHO-кондиціоноване середовище (надосадову рідину з верхньої фракції) очищали за допомогою колонки для афінної хроматографії з білком A MabSelect Sure (GE Healthcare). Елюат з низьким рН нейтралізували до рН 5,0 і додатково очищали за допомогою гел'фільтраційної колонки (GE Healthcare). Елюований пік поєднували, складали в суміш і піддавали фільтрації, що стерилізує. Статус глікозилювання Fc-ділянки химерного білка аналізували за допомогою мас-спектрометрії, як розглянуто нижче.

#### iv. Формування стабільних клонів, що експресують химерний білок IL-22 Fc

Плазмиду, що кодувала химерний білок IL-22 Fc, вводили в клітини CHO шляхом трансфекції із застосуванням ліпофектаміну Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen). Після трансфекції клітини центрифугували та повторно висіювали у безсироваткове селективне середовище. Відбирали ізоляти для секреції IL-22 Fc. Клони з найвищим титром, який був виявлений за допомогою ELISA, потім поєднували та масштабували для одержання продукту.

#### v. Експресія химерного білка IL-22 Fc в E. coli

Ферментовану E. coli сировину гомогенізували та кондиціювали до 0,4 % вага/вага PEI, рН 6,7, і центрифугували. Фугат очищали за допомогою колонки для афінної хроматографії з білком A MabSelect Sure (GE Healthcare). Елюат з низьким рН нейтралізували до рН 5,0 і додатково очищали за допомогою іонообмінної хроматографії. Фракції поєднували, складали в

суміш і піддавали фільтрації, що стерилізує.

#### Приклад 2

У химерного білка IL-22 Fc спостерігали високий відсоток афукозилювання в Fc-ділянці

У цьому дослідженні вивчали статус глікозилювання Fc-частини химерних білків IL-22 Fc.

Зразки очищених химерних білків IL-22 Fc з тимчасово трансфікованих клітин розщеплювали за допомогою трипсину (1:25 трипсин: IL-22 Fc, вага/вага) протягом 2 годин при 37 °C. Зразки підкисляли за допомогою трифтороцтової кислоти до кінцевої концентрації 0,1 % і вводили ін'єкцією в нагріту колонку C18 (PLRP-S, 1000A 8 мкм, Agilent), урівноважену за допомогою 0,05 % TFA у воді. Продукти розщеплення розділяли за допомогою лінійного градієнта ацетонітрилу (5-60 %) протягом 20-хвилинного періоду часу. Колонку безпосередньо з'єднували з отвором електророзпилювача TOF мас-спектрометра Agilent 6520B і визначали маси елюйованих фракцій у режимі визначення позитивних іонів. Оскільки Fc-частини цих химерних конструкцій були стабільні в розчині трипсину за таких умов розщеплення, то можна було проводити безпосереднє порівняння вуглеводного статусу різних химер IL-22.

Як показано на фігурі 2, як у химерних білків IL-22 IgG1, так і у химерних білків IgG4 Fc спостерігали аномально високі рівні афукозилювання. Розрахункові маси для глікозилюваного Fc типового моноклонального антитіла IgG1 були масами, які були відзначені як 53296, 53458 і 53620 Да на секції А фігури 2. Як правило, кожний основний вуглеводний компонент на кожному плечі Fc мав наступний вуглеводний склад: 4 N-ацетилглюкозамінів, 3 маннозних цукри й 1 фукозний цукор (які на піку відзначено 53296 у секції А). Додавання одного або двох галактозних цукрів давало піки, відзначені 53458 і 53620 Да, відповідно (секція А). Детектували незначну кількість молекул, що містили цукрові фрагменти, в яких була відсутня фукоза на одному плечі Fc ("1 фукоза").

На диво, у всіх химерних білків людський IL-22 IgG1Fc з різними конструкціями, в яких домен CH2 був глікозилюваним, спостерігали високий рівень афукозилювання, у тому числі цукрові фрагменти без глюкози на одному плечі ("1 фукоза") і на обох плечах Fc ("2 фукози"). Див. фігуру 2, секції B-D. Такі афукозилювані молекули становили до приблизно 30 % загального числа спостережуваних компонентів. Афукозилювання могло підвищувати небажані ефекторні активності химер IL-22 IgG1 Fc.

Відомо, що IgG4 має меншу ефекторну функцію у порівнянні з IgG1. Несподіванкою стало, що результати мас-спектрометричного аналізу також показували "1 фукоза" і "2 фукози" глікозилювані компоненти в розщеплених трипсином Fc-ділянках химерного білка людський IL-22 IgG4 Fc. Такі афукозилювані молекули становили більше 50 % від загального числа спостережуваних компонентів. Фігура 2, секція E. Афукозилювані антитіла мали набагато більші ADCC або CDC цитотоксичні активності, властивість, яка не бажана для таких химерних білків IL-22 Fc.

Відповідно, конструювали дві додаткові молекули IL-22 Fc, одна, що містила IgG1 Fc, а інша IgG4 Fc, у яких залишок в Fc, який у нормі глікозилюваний (N297), мутували в гліцин (N297G), у такий спосіб попереджаючи прикріплення цукру до основного компонента. Було показано, що вони були позбавлені яких-небудь цукрів на своїх Fc-частинах, і обоє характеризувалися своїми розрахунковими молекулярними масами Fc, виходячи з їхніх амінокислотних послідовностей (фігура 2, секції F і G).

На закінчення, у Fc-ділянки химерних білків людський IL-22 Fc, химери з Fc або IgG1, або IgG4, спостерігали високі рівні афукозилювання, які могли в результаті давати підвищені ADCC або CDC активності, властивість, яка небажана при застосуванні в якості терапевтичних засобів на основі IL-22. Тому, у наступних дослідженнях тестували неглікозилювані варіанти.

#### Приклад 3

Аналіз активності in vitro химерного білка IL-22 IgG1 і IgG4 Fc

IL-22 взаємодіє з рецепторним комплексом IL-22 й активує сигнальний шлях Jak-Stat. Активація STAT3 є основною подією в IL-22-опосередкованому сигнальному шляху. У цьому експерименті вимірювали in vitro активності химерних білків IL-22 Fc за допомогою аналізу репортерного гена люциферази. Конструювали клітини НЕК 293, що надекспресують людський рецепторний комплекс IL22, IL22R1 і IL10R2. На день 1 висіювали  $1 \times 10^5$  клітин 293 в 24-ямковій планшети в 0,4 мл модифікованого за Дульбекко середовища Ігла (DMEM) + 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS). На день 2 клітини трансфікували за допомогою репортера люциферази під керуванням STAT3 і контролю, що представляв собою люциферазу Renilla, із застосуванням ліпоектаміну Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в 0,1 мл середовища зі зниженим вмістом сироватки крові (Gibco Opti-MEM зі зниженим вмістом сироватки крові, який був знижений щонайменше на 50 %). Репортерна конструкція люциферази під керуванням STAT3 містила STAT3-сприйнятливу репортерну конструкцію люциферази, що містила тандемні

повтори *sis*-індукованого елемента (SIE) та репортерний ген люциферази світлячка. На день 3 химерні білки IL-22 Fc, вироблювані або тимчасовими, або стійкими клонами CHO, по капельно додавали в різних концентраціях в 0,5 мл середовища та додавали поверх трансфікованих клітин. На день 4 середовища видаляли та клітини лізували за допомогою 100 мкл буфера для пасивного лізису (що поставляється в аналітичній системі Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System). Дванадцять мікролітрів клітинних лізатів переносили в 96-ячковий планшет й аналізували за допомогою аналітичної системи Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System на люмінометрі (Promega). EC50 розраховували на основі дозозалежної активності у програмному забезпеченні GraphPad Prism (Ла-Хойя, Каліфорнія). Значення EC50 для різних химерних конструкцій IL-22 Fc показані в наведеній нижче таблиці 2.

Таблиця 2

Конструкція IL-22 Fc	Ізотип Fc	Лінкер	Вироблення	EC50 (нМ)
1	hulgG1	DKTHT (SEQ ID NO:32)	CHO	150-200
2	hulgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33)	CHO	350-500
3	hulgG1	VEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:34)	CHO	100-150
4	hulgG1	KVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:35)	CHO	50-75
5	hulgG1	KKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:36)	CHO	25-50
6	hulgG1	DKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:37)	CHO	25-50
7	hulgG1	VDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:38)	CHO	25-50
8	hulgG1	KVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39)	CHO	2,5-5
9	hulgG1	GGGDKTHT (SEQ ID NO:41)	CHO	50-75
10	hulgG1	GGGSTHT (SEQ ID NO:63)	CHO	50-100
11	hulgG1	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)	CHO	50-100
12	hulgG1	DKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:64)	CHO	25
13	hulgG1	KVDKKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:65)	CHO	25
14	hulgG1	DKTHT (SEQ ID NO:32)	CHO	150-200
		N297A		
15	hulgG1	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)	CHO	50-100
		N297A		
16	hulgG1	DKTHT (SEQ ID NO:32) (N297G)	CHO	150-200
17	hulgG1	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40) (N297G)	CHO	50-100
18	hulgG1	KKVEPKSSDKTHT (SEQ ID NO:66) (N297G)	CHO	20
19	hulgG4	SKYGPP (SEQ ID NO:43)	CHO	150-200
20	hulgG4	SKYGPP (SEQ ID NO:43)	CHO	75-100
		N297G		
21	hulgG4	RVESKYGPP (SEQ ID NO:44)	CHO	25-50
22	hulgG4	RVESKYGPP (SEQ ID NO:44)	CHO	50-75
		N297G		
23	hulgG1	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:42) (лінкер IgG3)	CHO	50-75
24	hulgG1	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)	E. coli	16
25	hulgG1-мономерний IL-22	EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40)	E. coli	82

Конструювали велику кількість химерних білків IL-22 Fc з лінкерами з різною довжиною та послідовностями для дослідження активностей, стійкості та виходу кожної конфігурації. Лінкери з нативними послідовностями IgG кращі для мінімізації потенційного ризику імуногенності; проте, лінкери даним винаходом ураховуються й охоплюються екзогенні послідовності, в яких спостерігали гарну *in vitro* активність.

Химерний білок IL-22 IgG1 Fc, що містив лінкер DKTHT (SEQ ID NO:32), тестували в STAT3-люциферазному аналізі. Див. таблицю 2. Для зменшення EC50 химерного білка довжину лінкера збільшували з 5 до 10 амінокислот, що становили нативну послідовність IgG1 EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:33). В отриманого химерного білка IL-22 Fc, проте, спостерігали

знижену *in vitro* активність. Див. таблицю 2. На диво, збільшення довжини лінкера навіть на одну амінокислоту VEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:34) підвищувало активність химерного білка IL-22. Додаткові збільшення довжини лінкера давали в результаті додаткове підвищення активності. Див.таблицю 2.

В окремих експериментах, Cys в EPKSCDKTHT заміняли на Ser для усунення можливості утворення дисульфідного зв'язку. Як показано в таблиці 2, у химери IL-22 Fc з лінкером EPKSSDKTHT (SEQ ID NO:40) спостерігали підвищену активність у порівнянні з вихідною лінкерною послідовністю з залишком Cys. Більш довга лінкерна послідовність, що вбудовувала попередні послідовності (у домен CH1 в IgG1), додатково підвищувала активність. У конструкції з мутацією N297G спостерігали схожі значення EC50 при порівнянні з аналогами дикого типу. Для подальших досліджень були вибрані химерний білок IL-22 IgG1 (N297G) Fc (SEQ ID NO:12) і химерний білок IL-22 IgG4 (N297G) Fc (SEQ ID NO:8).

*In vitro* активності химерного білка людський IL-22 IgG1 (N297G) Fc (SEQ ID NO:12) або химерного білка IL-22 IgG4 (N297G) Fc (SEQ ID NO:8), експресованих стабільними клонами, тестували в аналогічному аналізі. Дані на фігурі 4 демонструють представницькі результати. Як химерний білок IL-22 IgG1 Fc, так і химерний білок IL-22 IgG4 Fc індукували STAT3-активність залежним від дози способом. В обох химерних білків IL-22 Fc спостерігали схожу ефективність. У химерних білків IL-22 Fc, що експресуються в тимчасово трансфікованих клітинах, спостерігали схожі результати (дані не показані). В якості контролю в такому самому аналізі тестували нативний білок IL-22, що продукується клітинами CHO, і спостерігали в нього у два – три рази більш високу ефективність, ніж у химерних білків IL-22 Fc.

На закінчення, як у химерних білків IgG1 IL-22 Fc, так і у химерних білків IgG4 IL-22 Fc спостерігали *in vitro* активність, яка була продемонстрована за допомогою STAT3-люциферазного аналізу. Крім того, було показано, що химерні білки IL-22 Fc з лінкерами з різною довжиною та послідовностями активували IL-22R-опосередковану люциферазну активність.

#### Приклад 4

Химерні білки IL-22 Fc зменшували симптоми DSS-індукованого коліту в мишей

Індукований декстраном сульфату натрію (DSS) коліт є загальноприйнятою мишачою моделлю коліту. Пероральне введення води, що містить DSS, швидко ушкоджує епітеліальні клітини товстої кишки та викликає істотну втрату маси тіла й руйнування епітеліальної структури товстої кишки, характеризуване або імуногістохімічним (IHC) фарбуванням, або клінічною оцінкою гістології, проведеною патоморфологом. У такому дослідженні обґрунтованості концепції випробовували вплив химерного білка IL-22 Fc на DSS-індукований коліт.

У мишей C57BL/6 коліт індукували за допомогою питної води, що містила 3,5 % DSS, протягом п'яти послідовних днів, починаючи з дня 0. Вводили дозу білка мишачий IL-22 IgG2a Fc (SEQ ID NO:60), замітника для химерного білка людський IL-22 Fc, внутрішньочеревинним шляхом у кількості 5 мг/кг на день -1, 1, 4 і 6. Щодня вимірювали масу тіла тварин. На день 8 усіх тварин умертвляли та досліджували гістологію товстої кишки як за допомогою IHC-фарбування, так і за допомогою гістологічної оцінки вручну.

Як показано на фігурі 5, DSS-індукований коліт асоційований з різкою втратою маси тіла (фігура 5A), ушкодженням епітелію товстої кишки та запаленням товстої кишки (фігура 5B) і високим балом при оцінці гістології (фігура 5C). Обробка за допомогою IL-22Fc значимо попереджала втрату маси, відновлювала цілісність епітелію, послабляла запалення та зменшувала бал при оцінці гістології. Див. фігуру 5. Ефективність IL-22 Fc перевищувала ефект дексаметазону, стероїдного стандарту лікування (SOC), який викликав істотну втрату маси тіла в даному дослідженні.

#### Приклад 5

Фармакокінетичне дослідження химерного білка IL-22 Fc

Попереднє дослідження безпеки та PKPD на яванських макаках було схвалено Інституціональним комітетом з утримання та використання тварин (IACUC). Дослідження проводили в Charles River Laboratories (CRL), Preclinical Services (Піно, Невада). У загальній сумі 15 самців яванського макака (4-5 кг) з наявних у наявності в CRL випадково розподіляли на п'ять груп (n=3/група). Тваринам у групі 1 давали внутрішньовенну (i.v.) дозу контрольного наповнювача в дні 1 і 8. Тваринам у групах 2 і 3 давали однократну i.v. болюсну дозу IL22-Fc IgG1 у кількості 0,15 і 1,5 мг/кг, відповідно, у дні 1 і 8. Тваринам у групах 4 і 5 давали однократну i.v. болюсну дозу IL22-Fc IgG4 у кількості 0,15 і 1,5 мг/кг, відповідно, у дні 1 і 8. Збирали зразки сироватки в різні моменти часу для PK і PD аналізу від початкового моменту до дня 43 й оцінювали концентрації IL22-Fc за допомогою ELISA.

Для аналізу людського IL-22-Fc у сироватці яванського макака застосовували мишачі mAb



до людського IL-22 (Genentech) як антитіло захоплення в аналізі ELISA. Для побудови стандартної кривої використовували рекомбінантний химерний білок IL-22 Fc. IL-22-Fc, що зв'язався з планшетом, детектували в ході 1-годинної інкубації з HRP-кон'югованим мультиспецифічним мишачим mAb до людського Fc $\gamma$  (Genentech), розведеного до 500 нг/мл у буфері для розведення проб. Після кінцевого промивання додавали тетраметилбензидиновий субстрат для пероксидази (Moss, Inc., Pasadena, MD), давали виявитися кольору протягом 15 хвилин і зупиняли реакцію за допомогою 1 М фосфорної кислоти. Планшети зчитували на 450 нм із 620 нм еталонним фільтром за допомогою зчитувального обладнання для мікропланшетів. Концентрації химери IL-22 Fc розраховували, виходячи з чотирьох-параметричного згладжування стандартної кривої химери IL-22 Fc.

Для розрахунків PK-даних, день дослідження 1 перетворювали в PK-день 0, що вказував на початок введення дози. Всі моменти часу після прижиттєвого дня введення дози розраховували як день дослідження мінус 1. Дані за концентрацією в сироватці крові для кожної тварини аналізували за допомогою 2-компаратментного аналізу із застосуванням WinNonlin®, версії 5.2.1 (Pharsight; Маунтін-В'ю, Каліфорнія).

Концентрації у плазмі IL22-Fc демонстрували біекспоненціальне зниження після i.v. введення дози (0,15 мг/кг і 1,5 мг/кг) з короткою фазою розподілу та довгою кінцевою фазою виведення. Див. фігуру 6. Двокомпаратментну модель з лінійним виведенням IL-22 Fc із центрального компартмента добре описувала фармакокінетичні профілі для обох доз, свідчаючи про несуттєвий мішень-опосередкований розподіл в таких діапазонах доз.

Максимальна концентрація в сироватці ( $C_{\text{макс}}$ ) і площа під кривою залежності концентрації в сироватці від часу (AUC), розраховані за допомогою двокомпаратментного аналізу, були приблизно лінійними та дозопропорційними. Див. таблицю 3. Дозопропорційна кінетика свідчила про насичення IL-22R з тестованими дозами. Як показано на фігурі 6, для химер IL-22 IgG4 Fc, на диво, спостерігали в 2 рази більш повільний CL і більше ніж в 2 рази більш високу концентрацію у порівнянні з химерою IgG1 Fc. Без обмеження конкретними механізмами, більш швидкий кліренс (CL) химери IgG1 міг бути пов'язаний з меншою стійкістю химерної конструкції IgG1, оскільки більше ніж в 2 рази більш швидкий CL химери IL-22 IgG1 Fc, очевидно, в основному був обумовлений більшим об'ємом розподілу. Бета періоди напіввиведення, що становили 4-5 днів, були подібними у химер IgG1 і IgG4.

Таблиця 3

Група	AUC (день • мкг/мл)	$C_{\text{макс}}$ (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 період напіввиведення

#### Приклад 6

Оцінка in vivo активності IL-22Fc в яванського макака

Яванським макакам (*Macaca fascicularis*) внутрішньовенно вводили дозу химери IL-22 Fc з ізотипом IgG1 або IgG4, як було зазначено, з дозами, що становили 0,15 мг/кг або 1,5 мг/кг. IL-22, що зв'язується з рецептором IL-22, запускає експресію декількох генів, у тому числі сироваткового амілоїду А (SAA), RegIII/ панкреатит-асоційованого білка (PAP, також називаного PancrePAP) і ліпополісахарид-сполучного білка (LPS-BP). У даному дослідженні in vivo активності химерного білка IL-22 Fc аналізували шляхом вимірювання експресії SAA, PancrePAP і LPS-BP. Одержували зразки сироватки протягом періоду часу до та після введення дози як показано на графіку. Рівні циркулюючого в крові SAA мавпи кількісно оцінювали в сироватці крові із застосуванням комерційного набору для проведення твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) (каталож. № 3400-2), який можна придбати в Life Diagnostics (Вест Честер, Пенсільванія). Рівні циркулюючого в крові RegIII/PAP кількісно оцінювали в сироватці крові із застосуванням комерційного набору для проведення ELISA (каталож. PancrePAP), що випускається компанією Dynabio (Марсель, Франція).

Рівні ліпопротеїн-сполучного білка (LBP) у зразках сироватки крові визначали із

застосуванням належного ELISA. Біотинільований ліпопротеїн (Enzo Life Sciences, Фармінгдейл, Нью-Йорк) наносили на покритий стрептавідином титраційний мікропланшет (Thermo; Рокленд, Іллінойс). Рекombінантний людський LBP (R&D Systems, Inc., Міннеаполіс, Міннесота) застосовували в аналізах як стандарт. Аналіт LBP, що зв'язався, детектували за допомогою мишачого моноклонального антитіла до LBP (Thermo, Рокленд, Іллінойс). Для детекції застосовували Fc з кон'югованим з пероксидазою хрому (HRP)-F(ab')<sub>2</sub> фрагментом кози до –мишачого IgG (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсільванія). Колориметричні сигнали візуалізовували після додавання 3,3',5,5'-тетраметилбензидинового (TMB) субстрату (Kirkegaard & Perry Laboratories, Гейтерсберг, Меріленд). Реакцію зупиняли шляхом додавання 1 М фосфорної кислоти вимірювали поглинання на 450 нм із застосуванням 650 нм еталонного фільтра на читувальному пристрої для планшетів. (Molecular Devices, Санта-Кларита, Каліфорнія). З усіма зразками для ELISA проводили аналіз згідно з вказівками виробника та їх готували або в однократному розведенні у двох повторностях, або в чотирьох послідовних розведеннях в одній повторності, а інтерполювали щодо стандартної кривої. Реєстрували середнє значення для кожного зразка.

Як показано на фігурі 7, рівні білків SAA, LPS-BP і RegIII/PAP у сироватці крові індукували за допомогою IL-22Fc *in vivo*. У відмінних від людини приматів спостерігали *in vivo* дозозалежні відповіді, що вказувало на взаємодію з IL-22R і свідчило про насичення за допомогою IL-22Fc. У більшості випадків, не спостерігали підвищення рівнів білка в сироватці через 24 години після другої дози, що свідчило про те, що сироватковими білками SAA, LPS-BP і RegIII/PAP були досягнуті максимальні рівні. Рівні всіх трьох білків у сироватці крові повільно знижувалися протягом 35-денного періоду відновлення, повертаючись до вихідного рівня у більшості тварин. При цьому виключенням були рівні RegIII/PAP у групі високої дози IgG4, які, очевидно, залишалися підвищеними протягом 42-денного курсу. Це могло відображати поліпшену РК і підвищену концентрацію за AUC для химерного білка IL-22 IgG4 Fc у порівнянні з химерним білком IL-22 IgG1 Fc.

Приклад 7 – Обробка за допомогою IL-22 схильних до розвитку атеросклерозу мишей (Ldlr-/- Ароbes1-/-)

Недавні дослідження виявили роль IL-22 в імунному захисті від патогенних мікроорганізмів. Його сприятливі ефекти на гомеостаз тканини зі слизоватою оболонкою й імунітет наштовхнув авторів на ідею, що обробка IL-22 могла зменшувати ендотоксикоз і його патологічні наслідки, включаючи атерогенну дисліпідемію, системне запалення та надзвичайне вповільнення прогресування атеросклеротичної хвороби й пов'язаних з нею порушень, у тому числі цукрового діабету.

Для перевірки цієї гіпотези схильних до розвитку атеросклерозу мишей (Ldlr-/- Ароbes1-/-) лікували за допомогою конструкції IL-22-Fc. У цих мишей був відсутній рецептор LDL і синтез винятково apoB100. Ця модель унікальна в тому, що вона повторює основну частину патофізіології, асоційованої зі спадковою гіперхолестеринемією у людини. Зокрема, на кормовому раціоні в цих мишей розвивалися підвищений LDL холестерин, ліпідний профіль з розподілом холестерину, схожим з розподілом у людей, і прогресивне утворення бляшок. Крім того, Ldlr-/- Ароbes1-/- миші мали вимірювані фактори ризику, які сприяли розвитку в них серцево-судинного захворювання, у тому числі резистентності до інсуліну, системного запалення, прогресивний розвиток бляшок і дисфункції ендотеліальних клітин. У цьому випадку ми демонстрували, що 3 місяця обробки химерним білком IL-22-Fc могли значно поліпшити здоров'я серцево-судинної системи в цих тварин і зменшити прогресування атеросклерозу.

Матеріал і способи

Мишачі конструкції IL-22-Fc. Застосовувані в даному винаході конструкція та поліпептид IL-22-Fc, як правило, являли собою химерний білок IL-22-мишачий-Fc (SEQ ID NO:73), який показаний на фігурі 32A (і кодує його послідовність ДНК, яка показано на фігурі 32B, SEQ ID NO:72). Білок одержували в клітинах CHO у результаті тимчасових трансфекцій плазмідної ДНК. Химерний білок очищали шляхом прогону клітинної надосадової рідини через колонку з білком А з наступною іонообмінною хроматографією для усунення агрегатів. Період напівжиття в сироватці крові оцінювали шляхом введення ін'єкцією однієї дози 10 мг/кг IL-22-Fc у мишу C57B6 з наступним одержанням від миші сироватки крові через задані часові інтервали. Рівні IL-22-Fc у сироватці крові визначали за допомогою "сендвіч" ELISA із застосуванням mAb до IL-22. Для досліджень *in vivo* із застосуванням мишей з подвійним нокаутом Ldlr-/- Ароbes1-/- використовували конструкцію мишачого IL-22-Fc. Незважаючи на те, що були присутні та були використані мишачі послідовності, очікували, що в різних варіантах здійснення мишачі послідовності можна замінити людськими послідовностями.

Дослідження на мишах. Мишей з подвійним KO Ldlr-/- Ароbes1-/- розлучали в лабораторії з

розведення тварин Genentech, а мишей WT C57BL/6 здобували в Jackson Laboratory. Мишей тримали в стерильному віварії при 21 °C при стандартному циклі 12 годин день/12 годин ніч із доступом до корму: стандартному корму для гризунів (Labdiet 5010, 12,7 % калорій з жиру) або раціону з високим вмістом жирів і високим вмістом вуглеводу (Harlan Teklad TD.03584, 58,4 % калорій з жиру) і води без обмежень. db/db миші на фоні C57BLKS/J були самками, а всі інші використані в цьому дослідженні миші були самцями. Мишачий IL-22-Fc або контрольне антитіло IgG вводили внутрішньочеревинним (ip) шляхом, починаючи з віку 6 місяців у кількості 50 мкг/тиждень протягом трьох місяців (усього 12 тижневих доз).

Аналіз об'єму атеросклеротичних бляшок. Рентгеноскопичну комп'ютерну мікротомографію високого дозволу застосовували для кількісної оцінки об'єму атеросклеротичного ушкодження та складу атеросклеротичних бляшок. Тварин умертвляли за допомогою інгаляції діоксидом вуглецю, потім перфузували через лівий шлуночок серця десятима мілілітрами фосфатно-сольового буферного розчину, потім десятима мілілітрами десятипроцентного нейтрального забуференого формаліну. Аорти висікали та занурювали в десятипроцентний нейтральний забуферений формалін мінімум на двадцять чотири години та переносили в розчин двадцятипроцентного йодного рентгеноконтрастного засобу, Isovue 370 (Bracco Diagnostics Inc., Прінстон, Нью-Джерсі) у десятипроцентному нейтральному забуференому формаліні мінімум на дванадцять годин. Після промокування досуха аорти перфузували та занурювали в соєве масло (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі), середовище, що дає сигнал з низькою інтенсивністю від рентгенівських променів для формування фонового зображення. Зображення комп'ютерної мікротомографії одержували за допомогою  $\mu$ CT40 (Sanco Medical, Бассерсдорф, Швейцарія) з енергією захоплення зображення, що становила 45 кВ, струмом, що становив 160 мкА, часом інтегрування, що становив 300 мілісекунд, з трьома середніми та дозволом зображення, що становив дванадцять мікрометрів. Отримані зображення аналізували за допомогою Analyze (Analyzedirect Inc., Ленекса, Канзас) шляхом використання напівавтоматичної структурної фільтрації та заданих користувачем ділянок для визначення об'єму об'єкта та складу об'єкта.

Оцінка функції судин. Функцію судин визначали за допомогою ультразвукового дослідження стегнової артерії у відношенні потік-опосередкованого розширення та нітрогліцерин-опосередкованого розширення. Тварин умертвляли за допомогою двопроцентного ізофлурану та витримували при тридцяти семи градусах Цельсія протягом тридцяти семи хвилин ультразвукового дослідження. Naïr використовували для усунення волось з вентральної поверхні задніх кінцівок і забезпечення можливості одержання ультразвукового зображення за допомогою Vevo770 із застосуванням п'ятидесятип'ятимегагерцового інтроскопічного зонда (Visualsonics, Торонто, Канада). Для потоку-опосередкованого розширення одержували вихідне зображення стегнової артерії, потім аптечну гумку застосовували як тимчасову пов'язку для перекриття кровотока в стегновій артерії на чотири хвилини. Потім аптечну гумку послабляли для відновлення кровотока в стегновій артерії та щохвилини протягом чотирьох хвилин одержували й аналізували зображення відносно максимального діаметра стегнової артерії за допомогою програмних засобів, що поставляються виробником. Для опосередкованого нітрогліцерином розширення одержували вихідне зображення стегнової артерії, потім вводили внутрішньочеревинну ін'єкцію 20 мікрограм нітрогліцерину (Baxter, Дірфілд, Іллінойс) і щохвилини протягом чотирьох хвилин одержували й аналізували зображення відносно максимального діаметра стегнової артерії за допомогою програмних засобів, що поставляються виробником.

Визначення загальних холестерину, тригліцеридів і ліпопротеїнів. Для визначення розподілу загальних холестерину, тригліцеридів і ліпопротеїнів використовували свіжі зразки сироватки крові згідно з інструкціями виробника й із застосуванням аналітичної системи Cholestech LDX (Inverness Medical, Прінстон, Нью-Джерсі).

Вимірювання ліпополісахаридів у сироватці крові. Заморожені зразки сироватки крові відтаювали та розводили в сто раз у воді без ендотоксинів й інкубували при температурі дев'яносто градусів Цельсія протягом десяти хвилин у гарячій водяній лазні. Зразки потім обробляли згідно з інструкціями виробника на системі Endosafe-PTS system (Charles River Laboratories, Уілмінгтон, Массачусетс).

GTT: тест на толерантність до глюкози. Тест на толерантність до глюкози (GTT) проводили наприкінці періоду приймання доз за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції 1 г/кг глюкози після нічного голодування (14 годин). Рівні глюкози вимірювали за допомогою глюкометра One Touch Ultra. Споживану кількість їжі розраховували в ході дослідження шляхом індивідуального розміщення мишей на 4 дня, які являли собою акліматизаційний період, з наступним вимірюванням протягом одностижневого періоду.

Вимірювання рівнів цитокінів у сироватці крові. Рівні цитокінів у сироватці крові вимірювали

за допомогою панелі Luminex 23 Multiplex (BioRad) автоматизованим способом. Деякі результати незалежно підтверджували за допомогою спеціальних наборів Individual ELISA (R&D). Загальний холестерин і вільні жирні кислоти (FFA) (Roche) визначали за допомогою ферментативних реакцій.

#### 5 Результати:

Ldlr<sup>-/-</sup>-ApoBec1<sup>-/-</sup> миші точно моделювали атерогенну дисліпідемію та були сприйнятливі до стимулів, що викликають запалення. Ldlr<sup>-/-</sup>-ApoBec1<sup>-/-</sup> мишача модель мала рівні ліпопротеїнів і великі атеросклеротичні ушкодження, які характерні для атеросклеротичної хвороби в людей (Powell-Braxton et al. (1998). Nat Med 4(8): 934-8). МікроКТ аналіз дуги аорти в Ldlr<sup>-/-</sup>-ApoBec1<sup>-/-</sup> мишей виявляв об'єктивні ознаки атеросклеротичної хвороби, які визначали за допомогою методик автоматизованої обробки зображень на підготовлених зразках, які включали висхідний відділ аорти, дугу аорти, нисхідний відділ аорти та частину брахіоцефальної артерії. За допомогою такої методики також спостерігали високий ступінь гетерогенності, який відображав місцеві відхилення за тяжкістю та прогресуванням в об'ємі атеросклеротичних бляшок, які включали ліпідне ядро, ділянки зруйнованої бляшки та зону кальцифікації (фігура 8). Гетерогенність сигналу КТ відображає лежачу в основі патологію вогниць, яка узгоджується зі складною патологією бляшок людського захворювання. Для характеристики такої моделі та демонстрації її сприйнятливості до індукованого раціоном атерогенезу групу мишей обробляли за допомогою або раціону з високим вмістом жирів, або додавання фруктози в їхню питну воду (8 % мас/об'єм) протягом 2 місяців. В Ldlr<sup>-/-</sup>-ApoBec1<sup>-/-</sup> мишей спостерігали сприйнятливості до змін у їхньому раціоні за лише трохи підвищеним LDL у сироватці, але за істотним підвищенням об'єму атеросклеротичних бляшок у порівнянні з мишами на стандартному кормовому раціоні (фігура 9). Це демонструвало, що підвищення об'єму атеросклеротичних бляшок було викликано скоріше запаленням, ніж підвищенням LDL. Більше того, стимуляція гострого незначного запалення за допомогою LPS-стимулу (0,025 мг/кг) призводила в результаті до значного підвищення прозапальних маркерів в Ldlr<sup>-/-</sup>-ApoBec1<sup>-/-</sup> у порівнянні з wt контролями (фігура 10). Ldlr<sup>-/-</sup>-ApoBec1<sup>-/-</sup> мишей також піддавали постійному введенню доз LPS (750 нг, ip) протягом 8 тижнів і оцінювали відносно ліпідного профілю сироватки крові й об'єму бляшок. Як показано на фігурі 11, постійний вплив ендотоксину призводив у результаті до розвитку дисліпідемії та більшої нестабільності бляшок.

Після обробки за допомогою IL-22-Fc, в Ldlr<sup>-/-</sup>-ApoBec1<sup>-/-</sup> мишей спостерігали ослаблення атерогенної дисліпідемії та симптомів метаболічного синдрому. У цих мишей на кормовому раціоні спостерігали розвиток ознак метаболічного синдрому, у тому числі резистентності до інсуліну. При обробці за допомогою IL-22-Fc, глюкоза в крові натще зменшувалася у порівнянні з контролями, а кліренс глюкози підвищувався в групі обробки у порівнянні з контрольною групою (фігура 12). Таким чином, гомеостаз глюкози поліпшувався з нормалізацією толерантності до глюкози (GTT) і поліпшенням рівня глюкози натще (фігура 12). Як гіперхолестеринемія натще, так і гіперхолестеринемія після приймання їжі зменшувалася (фігура 13A) як і рівні TG після приймання їжі (фігура 13B), а ліпідні профілі поліпшувалися (фігура 14). Рівні LPS у плазмі крові зменшувалися після обробки за допомогою IL-22-Fc (фігура 15). Крім зменшення дисліпідемії та чутливості до інсуліну, спостерігали поліпшення ендотеліальної функції, вимірюваної за судинною реактивністю (фігура 16). Разом із ослабленням дисліпідемії, КТ-аналіз об'єму бляшок показував зменшення загального об'єму атеросклеротичних бляшок в аортальній дузі й у брахіоцефальній артерії та клапанах аорти (фігури 17A-C). Поліпшення ліпідного профілю та резистентності до інсуліну не було пов'язане зі зменшенням споживання калорій, оскільки споживання їжі, вимірюване протягом 7-денного періоду, підвищувалося незважаючи на помірне, але статистично значиме зменшення маси тіла, яке мало місце протягом 3 місяців обробки (фігура 18). Маса тіла в контрольній групі не змінювалася в ході здійснення 3-місячного протоколу обробки, а в групі обробки IL-22-Fc спостерігали значиме зменшення маси тіла від початку до кінця дослідження (фігура 18A). Середнє щоденне споживання їжі, вимірюване протягом 7-денного періоду в ході курсу дослідження обробки, підвищувалося в групі обробки IL-22-Fc у порівнянні з контрольною групою (фігура 18B).

#### 55 Приклад 8

##### 55 Модель захворювання периферичних артерій

50 Стимуляція IL-22-регульованих шляхів за допомогою IL-22-Fc для зменшення прогресування атеросклерозу є потенційно новою формою терапії суб'єктів із серцево-судинним захворюванням і пов'язаного з ним порушення, у тому числі цукрового діабету та хронічного захворювання нирок. Оскільки серцево-судинне захворювання, як правило, не обмежено однією ділянкою судинної системи суб'єкта, то суб'єкта, в якого діагностована наявність або він

підданий ризику наявності хвороби коронарних артерій, також вважають підданим ризику розвитку CVD, що мають інші форми, такі як порушення мозкового кровообігу, захворювання клубової артерії та захворювання периферичних артерій. Для перевірки IL-22 в якості мішені можна використовувати таку саму стратегію, як описана вище, із застосуванням мишачої моделі захворювання периферичних артерій. Конструкції IL-22-Fc одержували й оцінювали як описано вище. Також використовували всі необхідні контролю. Оцінювали агоністів/ антигоністів IL-22, і результати підтверджували шляхи IL-22 в якості мішеней для дослідження та розробки лікарського засобу.

Застосовували модель захворювання периферичних артерій (PAD), в основі якої лежить накладення лігатури на стегнову артерію для створення ішемічного ушкодження. Ефективність конструкцій IL-22-Fc оцінювали аналогічно раніше описаним процедурам (Couffignal et al., *Am. J. Pathol.* 152:1667 (1998); Takeshita et al., *Lab. Invest.* 75:487 (1996); Isner et al., *Human Gene Therapy* 7:959(1996)). Для перевірки здатності IL-22-Fc модулювати таке захворювання периферичних артерій використовували наступні експериментальні протоколи: а) із застосуванням гризуна (як і в описаному вище способі) на одну сторону стегнової артерії накладали лігатуру для створення ішемічного ушкодження м'яза задньої кінцівки (інша, неушкоджена задня кінцівка функціонувала як контроль); б) поліпептид IL-22-Fc (або його фрагмент) вводили тварині або внутрішньовенно, і/або внутрішньом'язово (в ушкоджену кінцівку) щонайменше 3х на тиждень протягом 2-3 тижнів з діапазоном дозувань; і с) ішемізовану м'язову тканину збирали через 1, 2 і 3 тижня після накладення лігатури для проведення аналізу на біомаркери та гістологічного дослідження. У цілому, (як і раніше) параметри для оцінки включали визначення життєздатності та васкуляризації тканини, що оточувала ішемізовану ділянку, у той час як більш специфічні параметри оцінки могли включати, наприклад, вимірювання кровотока шкіри, температури шкіри й імуногістохімію з фактором VIII і/або ендотеліальну реакцію на лужну фосфатазу. Експресію поліпептиду при ішемії досліджували за допомогою будь-якої відомої з рівня техніки методики гібридизації *in situ*. Також проводили біопсію на іншій стороні нормального м'яза протилежної задньої кінцівки для аналізу як контролю.

В альтернативному варіанті використовували інші мишачі моделі (Pownall et al. *US* 2011/0118173 A1). Існує декілька мишачих моделей атеросклерозу, які використовували для перевірки захисту від атеросклерозу. Вони включали апо-A-I KO, апо-E KO, цистатіонін-бета-синтазу, і аполіпопротеїн E, і апо-A-I/SR-BI з подвійним KO. Ці мишачі моделі атеросклерозу обробляли IL-22-Fc шляхом введення ін'єкцією, перорального дозування або обробки *ex vivo*. Вимірювання рівнів холестерину в крові після обробки IL-22-Fc виявляло негайне зниження загального холестерину в сироватці крові та підвищену кількість непро-HDL, наступну появу зрілих форм HDL, які містили холестерин, витягнутий з периферичної тканини за відповідний період часу в годинах.

#### Приклад 9

Ефект рекомбінантного IL-22 Fc у мишачих моделях цукрового діабету

У наших початкових дослідженнях для перевірки ефекту IL-22-Fc при метаболічних синдромах ми відзначали, що IL-22R KO миші були більш сприйнятливі до раціону, що викликав ожиріння та резистентність до інсуліну. У наступних експериментах ми спостерігали втрату жирової тканини після обробки рекомбінантним IL-22-Fc. У світлі цих даних ми вирішили перевірити роль рекомбінантних IL-22-Fc у мишачих моделях цукрового діабету. У даному дослідженні оцінювали такі кінцеві точки ефективності, як глюкоза натще та після приймання їжі, маса тіла та толерантність до глюкози й інсуліну.

Мишей (10 тварин/група) обробляли за допомогою або рекомбінантного IL-22-Fc, або антитіла до антигена амброзії в якості ізотипового IgG-контролю, даючи 2 дози/тиждень протягом 3 тижнів (фігура 19):

Група 1: db/db миші (BKS.Cg-Dock7(m)/+ Lepr(db)/J FAT): антитіло до антигена амброзії (50 мкг)

Група 2: db/db миші: рекомбінантний IL-22-Fc (50 мкг)

Група 3: миші з індукованим раціоном ожиріння (DIO): антитіло до антигена амброзії (50 мкг)

Група 4: миші з індукованим раціоном ожиріння (DIO): рекомбінантний IL-22-Fc (50 мкг)

Самок db/db мишей віком 12 тижнів здобували в Jackson Laboratory і використовували в експерименті. Перед дослідженням мишей акліматизували (щоденний відхід) протягом 7-10 днів після прибуття та розміщення окремо до початку експерименту. Протягом періоду від дня -5 до дня -1 забирали кров (3-5 мкл) через хвостовий надріз для щоденного вимірювання вихідного рівня глюкози. У день 0 білки вводили шляхом і.р. ін'єкції (150 мкл) у PBS з наступним

введенням доз два рази на тиждень протягом 3 тижнів. Кров (3-5 мкл) цього разу також забирали через хвостовий надріз для вимірювання глюкози в день 2, 4, 8, 10, 14, 18 і 21. Для вимірювання рК 30 мкл крові забирали через орбітальну артерію під анестезією в дні 2, 7, 13 і 20.

5 Рекомбінантний IL-22-Fc або ізотипове IgG-контрольне антитіло вводили дозами два рази на тиждень внутрішньочеревинним шляхом протягом трьох тижнів. Масу тіла та глюкозу після приймання їжі вимірювали кожні 2 дні до закінчення дослідження на день 23 і виміри глюкози робили через хвостовий надріз і вимірювали за допомогою глюкометра (фігури 20A-B). Для оцінки рівня глюкози натще та після прийому їжі до дня 10 ранком проводили виміри глюкози після приймання їжі, а потім мишей залишали без доступу до корму протягом 4 годин (год.) і проводили виміри глюкози за допомогою глюкометра (фігура 20C). Вплив IL-22-Fc призводив у результаті до значимого ефекту зниження рівня глюкози в db/db мишей.

10 Тест на толерантність до глюкози (GTT) проводили через 2 тижні після обробки за допомогою IL-22-Fc або IgG-контролем у кількості 50 мкг/доза два рази на тиждень. Мишам не давали доступ до їжі протягом ночі (14 годин). Рівень глюкози натще вимірювали ранком, і він служив у якості вихідного. Вимірювали масу тіла та забирали кров (3-5 мкл) через хвостовий надріз для вимірювання рівня глюкози. Розчин глюкози в кількості 1,5 мг/кг маси тіла вводили внутрішньочеревинно та кожні 30 хвилин проводили вимірювання рівня глюкози. Значення рівня глюкози представлені на графіку для 30, 120, 180 і 220 хвилин. На день 21 проводили ще один GTT після нічного голодування на день 20. Мишей щодня зважували. Всі групи умертвляли на день 23 і збирали тканини для гістологічного дослідження. Після обробки за допомогою IL-22-Fc спостерігали значиме поліпшення толерантності до глюкози та підвищення чутливості до інсуліну (фігура 21).

20 Тест на толерантність до інсуліну (ITT) проводили на день 20 на мишах, яких обробляли за допомогою IL-22-Fc або IgG-контролю в кількості 50 мкг/доза два рази на тиждень. Мишам не давали доступ до їжі протягом 4 годин і робили забір для вимірювання вихідного рівня глюкози. 1 мОд/кг маси тіла вводили внутрішньочеревинно та відслідковували рівні глюкози в крові шляхом забору через хвостові надрізи кожні 30 хвилин. Для розрахунків % зменшення глюкози вихідний рівень глюкози через 4 години голодування нормалізували до 100 %. Було показано, що обробка IL-22-Fc значимо підвищувала чутливість до інсуліну, вимірювану за допомогою тесту на толерантність до інсуліну (фігури 22A-B).

35 IL-22R характеризується високим рівнем експресії у підшлунковій залозі, особливо в ациноцитах, хоча статус його експресії в  $\beta$ -острівцевих клітинах усе ще не відомий. Досліджували інсулінові сигнали у підшлунковій залозі в db/db мишей, оброблених IL-22 Fc або контрольним білком. Гістологічну оцінку хворих цукровим діабетом мишей також проводили для оцінки експресії інсуліну в острівцевих клітинах і рівня перипортального жирового гепатозу в оброблених IL-22-Fc тварин. Імуногістохімічне дослідження на інсулін і глюкагон проводили на тканинах підшлункової залози, зафіксованих у формаліні та залитих парафіном, як було описано раніше (Wu et al. 2011, Science translational medicine 3, 113ra126, doi:10.1126/scitranslmed.3002669) із застосуванням антитіл кролика до глюкагону (Cell Signaling Technologies #2760) з кон'югованим з Alexa Fluor 555 вторинним антитілом кози до антитіл кролика або із застосуванням антитіла морської свинки до інсуліну (DAKO A0564) з кон'югованим з Alexa Fluor 647 вторинним антитілом кози до антитіл морської свинки. Відсоток площі інсуліну на площу острівця розраховували шляхом розподілу позитивної за інсуліном площі на площу острівця мінус площа ядра.

45 IL-22-Fc, очевидно, підвищувала експресію інсуліну в острівцях в db/db мишей (фігура 23A), а кількісний аналіз виявляв значиме підвищення як інтенсивності інсулінового сигналу (фігура 23 B і фігура 24), так і позитивної за інсуліном площі в оброблених IL-22-Fc тварин (фігури 25), у той час як IL-22 Fc не підвищував інтенсивність глюкагонового сигналу (фігура 23 C). Для позитивної за інсуліном площі видне 2,16-кратне збільшення при обробці IL-22-Fc у порівнянні з обробкою контролем-герцептином (95 % довірчий інтервал 1,25-3,72). Кількість і площа острівців не підпадала під вплив обробки IL-22 Fc. Але площа  $\beta$ -клітин на острівцях й інтенсивність інсулінового фарбування з обробленої за допомогою IL-22 Fc підшлункової залози значимо зростало (фігури 23 і 52).

55 У бета-клітин підшлункової залози мишей, що страждали ожирінням, спостерігали об'єктивні ознаки дегрануляції та дегенерації (дані не наведені). Статистично значиме більш сильне фарбування інсуліну спостерігали у бета-клітинах мишей, що страждали ожирінням, оброблених за допомогою IL22, у порівнянні з неопрацьованими мишами, що страждали ожирінням (фігура 23A, B). Підвищення, імовірно, було обумовлено підвищеним запасанням інсуліну в групі обробки IL22. Незважаючи на те, що в оброблених за допомогою IL22 мишей,

що страждали ожирінням, спостерігали більш високі рівні інсуліну в підшлунковій залозі, рівні інсуліну в сироватці крові фактично були зменшені у порівнянні з мишами, що страждали ожирінням, без обробки IL22, незалежно від ситого стану або натще (фігура 23D, E). Але оброблені за допомогою IL22, миші, що страждали ожирінням, відповідали на глюкозу шляхом вивільнення інсуліну за такою схемою, яка була більш схожа на мишей дикого типу на кормовому раціоні, у порівнянні з неопрацьованими мишами, що страждали ожирінням (фігура 23F). Таким чином, IL22 потенційно поліпшував гомеостаз глюкози в мишей, що страждали ожирінням, шляхом підвищення грануляції та поліпшення механізму контролю над вивільненням інсуліну в мишей, що страждали ожирінням.

Потім досліджували ефект IL-22 Fc на гомеостаз інсуліну. Мишей, яких годували HFD, обробляли за допомогою IL-22 Fc два рази на тиждень протягом 8 тижнів. Результати наведені (фігура 23D і E). З даних, представлених на фігурі 23F, видно рівні інсуліну в мишей через 0 або 30 хвилин після ін'єкції глюкози. Миші, яких годували HFD і обробляли за допомогою IL-22 Fc, але не контрольні HFD-миші, відповідали на ін'єкцію глюкози шляхом підвищення рівнів інсуліну в сироватці крові аналогічно мишам дикого типу на кормовому раціоні (нормальному раціоні). Див. фігуру 23 F. Таким чином, IL-22 поліпшував гомеостаз глюкози в мишей, що страждали ожирінням, і підвищував секрецію інсуліну у відповідь на глюкозу.

Для порівняння ми розглядали мишей з нокаутом за рецептором IL-22 і їх сприйнятливості до індукованого раціоном ожиріння (DIO) та резистентності до інсуліну. IL-22 R KO миша описано на фігурі 43 і нижче. Мишей з нокаутом за рецептором IL-22 і одноплідних контрольних мишей садили на 60 % раціон з високим вмістом жирів з 7-тижневого віку до 10 тижнів. Для оцінки толерантності до глюкози, індукованої раціоном з високим вмістом жирів (HFD), мишей позбавляли доступу до їжі на ніч і наступного дня ранком проводили тест на толерантність до глюкози. Для такого експерименту семитижневих IL-22 R KO мишей і одноплідних співпадаючих за віком контрольних тварин (WT: служили в якості дикого типу) садили на 60 % HFD на 10 тижнів. Мишам внутрішньочеревинно вводили ін'єкцією 1,5 мг/кг маси тіла глюкози та відслідковували рівні глюкози в крові кожні 30 хвилин протягом періоду, що становив 2 години. Розраховували та графічно представляли загальну площу під кривою для окремих мишей. З даних видно, що рівні глюкози були значимо вище в IL-22R KO мишей, виходячи із загальної площі під кривою (фігура 27A-B), що свідчило про те, що рецептор IL-22 відіграє деяку роль в HFD-індукованій толерантності до глюкози. Миші з нокаутом за рецептором IL-22 фактично набирали більшу масу тіла після HFD-годування у порівнянні з одноплідними контрольними WT мишами (фігура 28).

#### Приклад 10

Обробка за допомогою IL-22 схильних до розвитку атеросклерозу мишей (Ldlr-/-ApoBec1-/-), що призводила до зменшення LPS у сироватці крові та LDL/HDL у сироватці крові

Дев'ятимісячним Ldlr -/-, ApoBec1 -/- (dko) мишам вводили внутрішньочеревинно ін'єкцією 50 мкг химерного білка IL-22Fc або 50 мкг контрольного антитіла до антигена амброзії (n=6 на групу). Через сорок вісім годин тварин умертвляли та збирали сироватку крові. Аналізували ліпідні профілі за допомогою набору для аналізу Cholestech LDX й аналізували ендотоксин за допомогою набору для аналізу з лізатом амебоцитів Limulus. LPS у сироватці зменшувався на 50 % (p=0,0052), а LDL/HDL у сироватці зменшувався на 30 % (p=0,049) з IL-22-Fc у порівнянні з контрольним антитілом до Fc амброзії (фігура 29).

На закінчення, у мишей, оброблених химерним білком IL-22 Fc, були швидкі позитивні зміни у ліпідному профілі та зменшення ендотоксину в системному кровообігу.

#### Приклад 11

IL-22Fc прискорював закриття рани в мишачій моделі загоєння ран у хворих діабетом, незалежно від того, чи було це системне введення або місцеве застосування

#### Протокол

Конструкції IL-22-Fc як правило являли собою химерний білок IL-22-мишачий-IgG2a (SEQ ID NO:72 і 73), який показано на фігурах 32A-B.

Миші, які були використані в дослідженні: IL-22R KO мишей і одноплідних контрольних мишей дикого типу (WT) розводили у віварії Genentech. IL-22R KO миші описані на фігурі 43 і нижче. Використовували 9-тижневих самок мишей, хворих цукровим діабетом BKS.Cg-Dock7(m)/+ Lepr(db)/J FAT (db/db) і BKS.Cg-Dock7(m)/+ Lepr(db)/J lean (контрольні BKS). Мишей рандомізували в дослідженні за масою тіла та рівнем глюкози після приймання їжі.

Суворо дотримувалися протоколу з дослідження загоєння ран відповідно до Посібника з проведення хірургічних операцій зі збереженням життя на гризунах IACUC (IACUC Rodent Survival Surgery Guidelines). Протягом усієї процедури використовували методику, що включає стерильні умови (у тому числі стерильні рукавички, маску, медичний халат і простирадло). Після

початку стадії анестезії в хірургічній операції обривали дорсальну частину спини тварин (від області лопатки до області попереку), щетину видаляли за допомогою лосьона для видалення волосся (Nair або еквівалент), після цього промивали стерильною водою та попередньо обробляли за допомогою бетадинового скраба з наступним промиванням спиртом. Тварину розміщали у положенні черевом донизу, потім використовували 6 мм дерматом для розмітки підлягаючої видаленню області шкіри (стерильним маркером на кінчику дерматома потім торкалися шкіри). Робили по одній рані глибиною на всю товщину шкіри та з діаметром 6 мм на 1 см лівіше та правіше від серединної лінії. Видаляли нижчележащий перихондрій за допомогою распатора та дрібних ножиців.

Після цього навколо круглої рани за допомогою суперклею розміщали силіконову рамку товщиною 0,5 мм, внутрішнім діаметром 10-12 мм. Потім поверх рани та рамки наносили квадрат 2 см клею Tegaderm™ (3M, Сент-Пол, Міннесота) або Opsite® (Smith & Nephew, Inc., Сент-Пітерсберг, Флорида) і тварині дозволяли отямитися від амнезії.

Пов'язки Opsite® видаляли раз на два дні, оглядали рани, місцево наносили засоби для обробки (20 мкл тестованого матеріалу або сольового розчину) і наносили свіжу пов'язку. Раневу щілину розраховували шляхом вимірювання діаметра рани від дня 0 до кінця дослідження.

У деяких дослідженнях рівень глюкози після приймання їжі реєстрували після здійснення хвостового надрізу та за допомогою комерційного глюкометра Onetouch® (lifescan, Inc., Мілпітас, Каліфорнія).

#### Результати

В IL-22R-/- мишей спостерігали порушення в реакції загоєння шкірної рани

Роль передачі сигналу IL-22 у реакції загоєння шкірної рани досліджували на IL-22R KO (без передачі сигналу IL-22 і членів його сімейства IL-20 і IL-24). На фігурі 33 показана крива розміру раневої щілини як для IL-22RKO мишей (n=10), так і для контрольних IL-22RWT мишей (n=10) протягом 14 днів. Рану діаметром 6 мм створювали на день 0 і вимірювали щілину кожні 2 дня, починаючи з дня 4. У раневої щілини IL-22R KO мишей спостерігали значну затримку в закритті у порівнянні з одноплідним контролем WT на період від дня 8 до дня 14. Наприкінці дослідження (день 14) 100 % ран в WT мишей були закриті у порівнянні лише з 30 % мишей серед IL-22RKO мишей (p=0,005). Відмінності раневої щілини між IL-22RKO і контрольними WT мишами кваліфікували як значимі з  $P \leq 0,05$ .

Порушення загоєння ран у страждаючих ожирінням і цукровим діабетом мишей

Реакцію загоєння шкірної рани в стані цукрового діабету моделювали в доклінічному дослідженні за допомогою страждаючих цукровим діабетом мишей з нокаутом за рецептором лептину (BKS.Cg-Dock7(m)+/Lepr(db)/J FAT) (db/db) і контрольних худих WT мишей. Створювали круглі рани (6 мм) на спині миші та реєстрували закриття раневої щілини кожні 2 дня, починаючи від дня 4. На фігурі 34 показане закриття раневої щілини (у мм), вимірюване від дня 0 по день 27. Протягом усього періоду дослідження в ран страждаючих цукровим діабетом і ожирінням db/db мишей спостерігали статистично значиму затримку ( $P \leq 0,0001$ ) у закритті рани у порівнянні з худими мишами. До дня 14 100 % ран у мишей WT були закриті, у той час як жодна з ран в db/db мишей не була закрыта навіть на день 27 (фігура 35A). Згідно з результатами вимірювання рівнів РНК, у мишей дикого типу після здійснення раневого надрізу індукувалася експресія IL-22, але не в db/db мишей. Див. фігуру 35B.

IL-22Fc прискорював закриття рани в моделі загоєння ран у страждаючих цукровим діабетом

Оскільки в IL-22R-/- мишей спостерігали порушення закриття рани, то зробили припущення, що IL-22 міг впливати на закриття рани. На фігурі 36 показана схематична діаграма схеми дослідження. 9-тижневих самок db/db мишей, що страждають ожирінням, використовували для моделювання загоєння ран у страждаючих цукровим діабетом. Крім IL-22Fc (мишачого), в якості позитивного контролю використовували антитіло до антигена амброзії в якості контрольного Fc-білка й антитіло до FGFR1. Оскільки було показано, що антитіло до FGFR1 нормалізувало рівень глюкози в крові в такій доклінічній моделі, то його застосовували як контрольне антитіло. На фігурі 36 показана схематична діаграма схеми дослідження. Групами обробки були:

- антитіло до антигена амброзії (внутрішньочеревинно (i.p.) 50 мкг/доза, 8 доз);
- IL-22Fc (внутрішньочеревинно (i.p.) 50 мкг/доза, 8 доз);
- антитіло до FGFR1 (внутрішньочеревинно (ip), 0,5 мг/кг на день 0 і день 14).

Як в IL-22Fc, так і в антитіл до FGFR1 спостерігали статистично значимий ( $P \leq 0,001$ ) ефект у зниженні рівня глюкози в страждаючих цукровим діабетом мишей у порівнянні з обробкою антитілом до антигена амброзії (фігура 37). З даних (фігура 38) видно, що системне введення IL-22 Fc виявляло роззучий ефект на швидкість закриття рани у порівнянні з контрольною



обробкою антитілами до антигена амброзії. Відмінності раневої щілини були значимі, починаючи від дня 16 ( $P \leq 0,05$ ), і рани в оброблених за допомогою IL-22Fc мишей повністю закривалися до дня 27. В оброблених контрольним Fc антитілом, а також антитілами до FGFR1 мишей не відбувалося повне закриття ран навіть на день 27. На фігурі 39 показані результати вимірювання раневої щілини в окремих мишей на день 19, 21 і 27, де відмінності раневої щілини серед оброблених за допомогою IL-22 Fc груп у порівнянні з іншими 2 групами мали високу статистичну значимість ( $P \leq 0,001$ ).

Порівняння місцевої обробки щодо системного лікування за допомогою IL-22 Fc

На фігурі 40 показана схематична діаграма схеми дослідження. У цьому дослідженні порівнювали 2 способи обробки – місцеву обробку щодо системного лікування. Групи являли собою:

- антитіло до антигена амброзії (місцево 50 мкг/доза, 8 доз);
- IL-22Fc (місцево, 50 мкг/доза, 8 доз);
- IL-22Fc (внутрішньочеревинно (i.p.) 50 мкг/доза, 8 доз).

З графіка на фігурі 41 видно, що як місцева обробка за допомогою IL-22-Fc, так і системне введення IL-22-Fc прискорювали закриття рани у порівнянні з обробкою контрольним антитілом. Результати вимірювання раневої щілини статистично значимо ( $P \leq 0,001$ ) відрізнялися у періоді від дня 16 до дня 22. Не спостерігали значимої відмінності зі швидкістю закриття рани між групами місцевої обробки та системного лікування за допомогою IL-22 Fc. Див також фігуру 42.

#### Приклад 12

У страждаючих ожирінням мишей спостерігали знижену індукцію IL-22

У наведених далі експериментах досліджували регуляцію IL-22 у ході імунних реакцій у страждаючих ожирінням мишей. Основними джерелами IL-22 серед лейкоцитів є лімфоцити вродженого імунітету (ILC) і підкласи Т-хелперів, особливо Th17 і Th22 клітини. Досліджували вироблення IL-22 в CD4+Т-клітин при стимуляції антигеном у дефіцитних за рецептором лептину db/db мишей.

#### Протокол

In vivo обробка за допомогою OVA і флагеліну. Для активації CD4 Т-клітин in vivo 100 мкг OVA, емульгованого у повному ад'юванті Фрейнда (CFA) вводили підшкірною ін'єкцією в нижню частину спини тварин і на день 7 збирали пахові лімфатичні вузли. Для активації TLR5 вводили внутрішньовенною ін'єкцією 3 мкг ультра-чистого флагеліну (Invivogen) і через 2 години збирали зразки сироватки крові.

Миші. Дефіцитних за рецептором лептину мишей (db/db; BKS.Cg-Dock7<sup>m</sup>/+ Lep<sup>rdb</sup>/J або B6.BKS(D)-Lep<sup>rdb</sup>/J), дефіцитних за лептином мишей (ob/ob; B6.Cg-Lep<sup>ob</sup>/J) і відповідних їм худих контрольних мишей, а також мишей на раціоні з високим вмістом жирів (C57BL/6J 60 %DIO) і контрольних мишей на стандартному кормовому раціоні здобували в Jackson Laboratory. Дефіцитні за IL-22 миші (Zheng et al, 2007, Nature 445, 648-651) і дефіцитні за IL-22Rα1 миші (описані на фігурі 43 і нижче) були створені компанією Lexicon Pharmaceuticals і піддані поворотному схрещуванню з лінією C57BL/6 більше 10 разів. Якщо було зазначено, мишей годували раціоном зі скоректованим вмістом калорій (HFD, що містив 60 % жиру, Harlan), починаючи з віку 4–6 тижнів. Для дослідження метаболізму використовували мишей віком 12–18 тижнів, у той час як для дослідження інфекцій *S. rodentium* використовували мишей віком 5–6 тижнів. Усі експерименти на тваринах були схвалені Інституціональним комітетом з утримання та використання тварин компанії Genentech.

Очищення та диференціювання наївних CD4 Т-клітин. Наївні CD4 Т-клітини сортували та стимулювали як описано раніше (Rutz, et al. 2011, Nature Immunol. 12:1238-45) і культивували в спеціальних умовах для кожного підкласу аналогічно раніше описаному способу. Id. Для індукції IL-22, якщо було зазначено, застосовували антитіла до IL-4 (10 мкг/мл), антитіло до IFN-γ (10 мкг/мл), і рекомбінантний IL-6 (20 нг/мл); додавали рекомбінантний мишачий лептин (1 мкг/мл, R&D systems).

Внутрішньоклітинне фарбування й ELISA на IL-22. Очищені з дренажних лімфатичних вузлів лімфоцити фарбували на IL-22 і IL-17A як описано раніше (Zheng et al., раніше) за допомогою зшитого з фікоеритрином (PE) антитіла до IL-22 (1H8PWSR, ebioscience) і зшитого з флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) антитіла до IL-17A (17B7, ebioscience). ELISA на IL-22 проводили як описано раніше (Zheng et al., раніше) із застосуванням моноклональних антитіл до IL-22 (20E5 і 14B7, Genentech).

Виділення РНК і ПЛР у режимі реального часу. Збирали й обробляли товсту кишку та виділяли іРНК за допомогою набору Rneasy mini plus kit (Qiagen). Рівні іРНК IL22, IL22ra1 і Reg3b оцінювали за допомогою аналізу ПЛР у режимі реального часу як повідомлялося раніше (Ota et al. 2011, Nature immunol. 12, 941-948). Результати нормалізували до результатів контрольного

гена "домашнього господарства" Rpl19 (що кодує рибосомальний білок L19) і реєстрували як 2<sup>ΔCT</sup>. Послідовності праймерів і зондів для Il22 і Reg3b були наведені раніше. Id. Для Il22ra1 застосовували 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) і 5'–FAM–CCA CCC CAC ACT CAC ACC GG–TAMRA–3" (SEQ ID NO:76).

Статистичний аналіз Увесь статистичний аналіз проводили за допомогою двовибіркового t-критерію для незалежних вибірок. Р-значення менше 0,05 вважали статистично значимим.

#### Результати

Після імунізації мишей овальбуміном (OVA) у повному ад'юванті Фрейнда (CFA) ex vivo детектували експресувавши IL-22 CD4 T-клітини за допомогою внутрішньоклітинного фарбування цитокінів. Кількість IL-22<sup>+</sup>T-клітин значимо зменшувалося в db/db мишей (фігури 44 A-B). Відповідно до попередніх результатів, кількість IL-17<sup>+</sup>CD4 T-клітин також значимо зменшувалося в db/db мишей (фігура 45A). Аналогічні результати спостерігали також у дефіцитних за лептином ob/ob мишей (фігура 45B). Лептин може регулювати Th-клітини, такі як Th1-клітини та Treg-клітини. Проте, не спостерігали безпосереднього впливу лептину на вироблення IL-22 в in vitro диференційованих Th22-клітин (фігура 45C). Більше того, аналогічне зменшення кількості T-клітин, що виробляли IL-22, також спостерігали в імунізованих DIO (з індукованим раціоном ожирінням або яких годували HFD) C57BL/6 (фігури 44C і D), що свідчило про те, що ожиріння, але не відсутність передачі сигналу за участю лептину, могло бути відповідальним за зменшене вироблення IL-22 в CD4<sup>+</sup>T-клітин. Активація TLR5-шляху за допомогою флагеліну могла б стимулювати вироблення IL-22 в ILC.

В db/db мишей (фігура 44E), ob/ob мишей (фігура 45E) і DIO мишей (фігура 44F) рівень IL-22 у сироватці крові був значимо нижче, ніж у WT мишей при in vivo стимуляції флагеліном. Відповідно до результатів, отриманих від T-клітин, сам по собі лептин не підвищував вироблення IL-22 в ILC in vitro (фігура 45D). У своїй сукупності ці дані свідчили про те, що мало місце загальне порушення в індукції IL-22 як в ILC, так і в T-клітин страждаючих ожирінням мишей.

#### Приклад 13

Захист на рівні слизуватих оболонок була порушена в дефіцитних за лептином мишей і відновлювалася за допомогою химерного білка IL-22 Fc

IL-22, вироблюваний ILC і T-клітинами, необхідний для імунного захисту від інфікування *Citrobacter rodentium* у товстій кишці. Аналізували індукцію IL-22 у товстій кишці від db/db і ob/ob мишей, інфікованих *C. rodentium*. *C. rodentium* культивували протягом ночі та мишей перорально заражали  $2 \times 10^9$  CFU бактерій, як було описано раніше (Zheng et al. 2008, Nature medicine 14, 282-289, doi:10.1038/nm1720). Бактеріальне навантаження аналізували в такий спосіб: селезінку та печінку інфікованих мишей збирали, зважували та гомогенізували в 0,1 % NP40/PBS у C-пробірці за допомогою gentleMACS (Miltenyi Biotec). Серійно розведені гомогенати висіювали на агар MacConkey (Remel) і виявляли колонії *C. rodentium* як рожеві колонії, що розвилися після інкубування протягом ночі при 37°C. Якщо було зазначено, мишам вводили внутрішньом'язовою ін'єкцією IL-22–Fc (150 мкг/доза) або еквівалентну кількість мишачого ізотипового контролю 3 рази на тиждень. Гістологічний аналіз товстої кишки від мишей, інфікованих *C. rodentium*, проводили як описано раніше (Ota et al. 2011, Nature immunology 12, 941-948, doi:10.1038/ni.2089) і оцінювали зміни епітелію (проліферацію, пузиріння, лущення ентероцитів), запалення та товщину слизуватої оболонки. Клінічні оцінки проводили для чотирьох анатомічних областей – проксимального, серединного та дистального відділу товстої кишки й прямої кишки – за шкалою від 0 до 5, при цьому 0 = нормальна товста кишка, а 5 = важке захворювання. Оцінки за областями підсумували з одержанням кінцевої оцінки тяжкості захворювання товстої кишки для кожної тварини.

На додаток наведеним вище результатам, пікова індукція IL-22 на день 4 у товстій кишці в db/db і ob/ob мишей також значимо зменшувалася, але повністю не припинялася (фігура 46A). В db/db мишей після перорального зараження *C. rodentium* була відсутня значима втрата маси (фігура 46B). На диво, інфіковані db/db миші починали вмирати через 10 днів після зараження бактеріями та приблизно 60 % - 100 % db/db мишей гинули протягом другого тижня інфекції при повторних експериментах (фігура 46C). Гістологічний аналіз зрізів товстої кишки від db/db мишей виявляв підвищену інфільтрацію запальних клітин і серйозні ушкодження епітелію, у тому числі лущення епітелію на поверхні слизуватих оболонок (фігури 46 D-F). Крім того, у цих мишей спостерігали осередкові набряки підслизуватої оболонки та багатоосередкові бактеріальні колонії, які найчастіше були асоційовані з локальним некрозом. Значимо підвищені бактеріальні навантаження також детектували як у печінці, так і в селезінці db/db мишей (фігури 46 G-H). Схожі порушення захисту на рівні слизуватих оболонок спостерігали також в ob/ob

мишей (фігура 54). Несподіванкою було те, що в db/db мишей мало місце значиме порушення у боротьбі з інфекцією *S. rodentium*; особливо з урахуванням того, що індукція IL-22 інфекцією *S. rodentium* у цих мишей була лише частково порушена (див. фігуру 46A).

Мали місце повідомлення, що в дефіцитних за лептином мишей також були порушення В-клітинних функцій та на пізній фазі інфекції для остаточного усунення бактерій у хазяїна необхідно було антитіло проти *S. rodentium*. Тому в таких мишей досліджували вироблення антитіла до *S. rodentium*. Зразки сироватки крові збирали шляхом кровопускання з підщелепної вени на 10 день після інфікування. На планшет для ELISA наносили покриття з інактивованим теплом *S. rodentium* або козиного антитіла захоплення до Ig миші. Планшет з нанесеним покриттям промивали промивним буфером (0,05 % твін 20 у PBS), блокували протягом 2 годин блокувальним буфером (0,5 % BSA, 15 ppm прокліну в PBS) і промивали перед додаванням серійно розведеного стандартного моноклонального IgG миші (SouthernBiotech) або зразків сироватки крові. Через 2 години інкубації при кімнатній температурі планшет промивали та детектували Ig за допомогою антитіла кози до IgG миші, кон'югованого з пероксидазою хрому (HRP) (SouthernBiotech), розведеного 1/4000 у розчині для розведення (0,5 % BSA, 0,05 % твін 20, 15 ppm прокліну в PBS), і інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після промивання в кожну ямку додавали пероксидазний субстрат TMB (Sigma-Aldrich). Зчитували поглинання на 650 нм у зчитувальному пристрої для планшетів (Molecular Devices).

Титр антитіла IgG до *S. rodentium* був значимо зменшений у db/db мишей, що вижили, на 14 день після інфікування (фігура 46I). Проте, зменшене вироблення IgG до *S. rodentium* само по собі також не повинно було призводити до спостережуваної ранньої смертності, оскільки дефіцитні за Rag2 миші, в яких повністю були відсутні В-клітини та вироблення антитіл, могли виживати набагато довше після інфікування (Zheng et al. 2008, Nature medicine 14, 282-289). Таким чином, незадовільний імунний захист від *S. rodentium* в db/db мишей, як видно, був викликаний порушеннями як в адаптивній відповіді з виробленням антитіл, так і в індукції IL-22 в ILC. Потім проводили експеримент із дослідження того, чи міг IL-22, у результаті введення екзогенного IL-22-Fc, відновлювати захисні властивості слизоватих оболонок в db/db мишей при інфікуванні *S. rodentium*. Як показано на фігурі 46 J, незважаючи на те, що основна частина контрольних IgG-оброблених db/db мишей гинула, майже всі оброблені за допомогою IL-22 Fc db/db миші переживали інфекцію (фігура 46J), що підтверджувало, що IL-22 Fc міг терапевтично відновлювати порушення імунних реакцій на рівні слизоватих оболонок в db/db мишей.

#### Приклад 14

IL-22 Fc зменшував рівні глюкози в страждаючих ожирінням мишей і нормальних мишей, яких годували раціоном з високим вмістом жирів

Як раніше описано у Прикладі 9, IL-22 Fc зменшував рівні глюкози в db/db мишей, в яких уже розвилася гіперглікемія (фігура 20A). Терапевтичний ефект був стійким протягом курсу введення IL-22-Fc. Через 3 тижні обробки рівень глюкози в таких мишей падав нижче 200 мг/дл, близькому до нормального рівня глюкози у WT мишей, у той час як в оброблюваних контрольним білком db/db мишей зберігався їх високий рівень глюкози. Зниження глюкози в оброблених за допомогою IL-22 Fc мишей було більш очевидним, якщо миші були в стані натще (фігура 20C). Обробка за допомогою IL-22 Fc також призводила в результаті до тенденції втрати маси або збільшення маси, що затримується, у порівнянні з контрольною обробкою. Проте, наприкінці такого дослідження різниця мас у двох груп таких мишей не досягала статистичної значимості (фігура 20B). У підтвердженні цих даних, обробка IL-22 Fc призводила до розвитку значимо зменшеної толерантності до глюкози та підвищеної чутливості до інсуліну в тесті на толерантність до глюкози та тесті на толерантність до інсуліну (фігури 21 і фігура 22, відповідно).

Для підтвердження загальних сприятливих дій екзогенного IL-22 у модулюванні метаболічних порушень IL-22 Fc вводили протягом 4 тижнів C57BL/6 мишам, яких попередньо годували HFD протягом щонайменше 8 тижнів для індукції толерантності до глюкози. Для проведення тесту на толерантність до глюкози (GTT) мишей позбавляли доступу до їжі на ніч і вводили і.р. ін'єкцією розчин глюкози в кількості 1,5 мг/кг. Для проведення тесту на толерантність до інсуліну (ITT) мишам вводили і.р. ін'єкцією розчин інсуліну в кількості 1,0 одиниці/кг. Рівень глюкози в крові вимірювали до та після ін'єкції. Глюкозу в крові вимірювали за допомогою системи Contour (Bayer).

Відповідно до результатів, отриманих від db/db мишей, обробка за допомогою IL-22 Fc значимо зменшувала рівень глюкози в сироватці крові, особливо після голодування (фігура 47A). Також мала місце зменшена маса тіла (або збільшення маси, що затримується) в оброблюваній за допомогою IL-22 Fc групі наприкінці дослідження (фігура 47B). Крім того, IL-22 Fc знижував порушення толерантності до глюкози та резистентності до інсуліну в C57BL/6

мишей, яких годували HFD (фігури 47C і D). Аналогічні результати одержували при паралельному введенні мишам IL-22 Fc на початку годування HFD (фігура 48). У своїй сукупності ці дані демонстрували, що IL-22 Fc являв собою потенційний терапевтичний засіб для нормалізації концентрації глюкози в сироватці крові та зменшення порушення толерантності до глюкози та резистентності до інсуліну в страждаючих ожирінням мишей.

#### Приклад 15

IL-22 Fc зменшував споживану кількість їжі та підвищував експресію PYY у мишей, які страждали ожирінням і яких годували HFD

Зменшення споживаної кількості їжі могло обертати гіперглікемію та резистентність до інсуліну в страждаючих цукровим діабетом мишей. Дійсно, в db/db мишей, оброблених за допомогою IL-22 Fc, спостерігали значиме зменшення споживання їжі у порівнянні з контрольною групою (фігура 49A). Проводили експерименти з однаковим харчуванням для того, щоб упевнитися в однакових показниках споживання їжі в оброблюваних IL-22 Fc і контролем мишей (фігура 50). Споживання їжі вимірювали для групи, яку годували без обмежень, щодня протягом дослідження. Подавану їжу для групи з таким самим харчуванням обмежували для приведення у відповідність зі споживаною кількістю їжі на попередній день у групі, яку годували без обмежень. Відповідно, обробка та вимірювання у групи з таким самим харчуванням були наступного дня після групи, яку годували без обмежень.

Навіть у таких умовах IL-22 Fc значимо зменшував рівень глюкози в сироватці крові, хоча й у більш пізній момент часу (фігура 49B), і обертав толерантність до глюкози в db/db мишей (фігура 49C), що свідчило про те, що модуляція споживаної кількості їжі за допомогою IL-22 була не єдиним механізмом для досягнення терапевтичного ефекту при метаболічному захворюванні. Аналогічні результати спостерігали в мишей, яких годували HFD (дані не наведені). Для додаткового розуміння того, як IL-22 регулював споживану кількість їжі та метаболізм, досліджували експресію гормонів кишечника, PYY, який відомий як гнітючий споживання їжі.

Мишам вводили і.р. ін'єкцією 50 мкг IL-22–Fc на день 0 і 2. На день 4 мишей позбавляли доступу до їжі на ніч і відновляли годування на 1 годину на день 5. Зразки крові забирали на день 2 до обробки та на день 5 після годування. Всі зразки сироватки крові відразу після забору змішували з інгібітором протеаз (Sigma), інгібітором DPPIV (Millipore) і Pefabloc (Roche). PYY вимірювали за допомогою набору PYY ELISA kit (Abnova) згідно з інструкціями виробника. З результатів видно, що обробка за допомогою IL-22 Fc значимо підвищувала концентрацію PYY у сироватці крові db/db мишей і мишей, яких годували HFD (фігури 49 D і E). Для демонстрації того, що ефект IL22 на споживання їжі був опосередкований стимуляцією вироблення PYY, досліджували споживання їжі в мишей, оброблених за допомогою інгібітора PYY, BIIЕ0246. C57BL/6 мишей на нормальному раціоні або залишали без обробки, або обробляли за допомогою IL-22 Fc на день 2 і день 4. Після голодування протягом ночі вимірювали споживання їжі протягом 4-годинного періоду годування. З результатів видно, що зменшення споживання їжі в оброблених за допомогою IL-22 Fc мишей зверталось під дією BIIЕ0246 (дані не наведені), що вказувало на те, що ефект IL-22 Fc на зменшене споживання їжі був опосередкований індукцією PYY.

#### Приклад 16

IL-22 Fc зменшував LPS у сироватці крові й ALT і AST печінки та підвищував метаболізм ліпідів у страждаючих ожирінням мишей

Оскільки рецептор IL-22 експресується у багатьох органах, у тому числі печінці та підшлунковій залозі, які регулюють метаболізм, то імовірно, що терапевтичні ефекти IL-22 при метаболічних захворюваннях опосередковується різними механізмами. Метаболічний ендотоксикоз вносить вклад у запальний статус, а резистентність до інсуліну та модуляція кишкової мікробіоти підвищують толерантність до глюкози. Ендотоксин у сироватці крові вимірювали за допомогою набору для аналізу з лізатом амебоцитів Limulus, QCL-1000 (Lonza), згідно з інструкціями виробника. ALT і AST вимірювали за допомогою аналізатора Cholestech LDX (Alere). З результатів, показаних на фігурі 49F, видно, що обробка за допомогою IL-22 Fc призводила в результаті до значимого зменшення кількості LPS у сироватці крові від db/db мишей.

IL-22 міг репресувати залучені в ліпогенез гени та полегшувати жировий гепатоз печінки. Потім досліджували рівні ALT і AST у сироватці крові. Глюкозу в крові вимірювали за допомогою системи Contour (Bayer). ALT і AST вимірювали за допомогою аналізатора Cholestech LDX (Alere). Як показано на фігурах 51A і B, обробка за допомогою IL-22 Fc знижувала рівні ALT і AST у сироватці крові в db/db (фігура 51A) мишей і мишей, яких годували HFD (фігура 51B). Абдомінальний жир також значимо зменшувався при обробці за допомогою IL-22 Fc у мишей,

яких годували HFD (фігура 51C). Крім того, у первинних адипоцитів під дією IL-22 індукувалися гени, відповідальні за метаболізм ліпідів (фігура 51D). Потім досліджували ефект IL-22 на вміст тригліцериду й холестерину в печінці та жировій тканині. З результатів видно, що IL-22 Fc зменшував вміст тригліцериду, холестерину та вільних жирних кислот (FFA) (фігура 51E), а також печінкового тригліцериду (фігура 51F), печінкового холестерину (фігура 51G) і тригліцериду в білій жировій тканині (фігура 51H) у мишей, яких годували HFD. Аналогічним чином, IL-22 зменшував вміст тригліцериду в печінці та білій жировій тканині в db/db мишей (фігура 51I і фігура 51J). Додаткові експерименти показували, що обробка за допомогою IL-22 Fc зменшувала запальні цитокіни, такі як TNF $\alpha$  і IL-1 $\beta$ , у порівнянні з відсутністю обробки в страждаючих ожирінням мишей (дані не наведені). Г/Е фарбування зрізів печінки виявляло зниження перипортального жирового гепатозу при обробці за допомогою химерного білка IL-22 Fc (фігура 26).

IL-22 передає сигнали через IL-22R1 і IL-10R2 ланцюги. IL-22R1 також може сполучатися з IL-20R2 ланцюгом і використовуватися IL-20 і IL-24. Було показано, що всі ці ліганди індукували дуже подібні наступні біологічні ефекти, починаючи від епідермісу шкіри (Sa et al., 2007, J Immunol 178, 2229-2240). Таким чином, дефіцитних як за IL-22, так і за IL-22R1 мишей досліджували для того, щоб уникнути потенційного дублювання інших цитокінів при індукованому за допомогою HFD цукровому діабеті. Створення нокаутних за IL-22R мишей проілюстровано на фігурі 43 А. Делецію IL-22R1 в КО мишей підтверджували за відсутністю iPHK IL-22R1 в IL-22R КО мишей та відсутністю експресії iPHK RegIIIb у відповідь на IL-22 Fc в IL-22R КО мишей. Див. фігури 43 В і С. Крім того, введення IL-22-Fc IL-22R КО мишам не індукувало pStat3 (дані не наведені).

Не спостерігали відмінності за толерантністю до глюкози та маси тіла в дефіцитних за IL-22 мишей від мишей одноплідних контролів WT (фігура 53). При обробці дефіцитних за IL-22R1 мишей згідно з раціонами з високим вмістом жирів протягом трьох місяців, проте, у цих мишей розвивалася значимо більш важка толерантність до глюкози та сильніше збільшувалася маса (фігури 49G, H і I), що підтверджувало важливу роль шляху IL-22R у керуванні метаболізмом. Досліджували можливість дублювання IL-20 і IL-24 при зменшенні метаболічного синдрому. У цьому експерименті db/db мишей обробляли за допомогою IL-20 Fc, IL-22 Fc або IL-24 Fc. З результатів видно, що тільки IL-22 Fc зменшував рівень глюкози в сироватці крові (фігура 55B) і зменшував толерантність до глюкози в аналізі GTT на день 20 (фігура 55C) в db/db мишей, у той час як обробка db/db мишей за допомогою IL-20 Fc або IL-24 Fc не зменшувала. Зменшення маси тіла не було статистично значимим. У додаткових експериментах спостерігали, що, хоча IL-20 Fc і IL-24 індукували pStat3 у первинних адипоцитів, ці цитокіни не індукували pStat3 у тканині печінки від db/db мишей, які ставали несприйнятливими до інсуліну (дані не наведені). Обробка IL-22 Fc в IL-22R КО мишей не виявляла ефекту в тесті на толерантність до глюкози, що підтверджувало, що ефект IL-22 Fc проявлявся завдяки проведенню сигналу від IL-22 R (дані не наведені).

Представлені в даному документі результати досліджень вказують на важливі функції IL-22 у регулюванні метаболічних процесів. Дефіцитні за IL-22R1 миші були схильні до розвитку метаболічних синдромів. Екзогенний IL-22 не тільки міг відновлювати порушення імунних реакцій на рівні слизових оболонок у доклінічних моделях цукрового діабету, але також сприяв нормалізації глюкозного та ліпідного метаболізму. Таким чином, IL-22 може забезпечити новий терапевтичний підхід для лікування метаболічних порушень у людини.

#### Приклад 17

##### Порівняння VEGF і IL-22 у стимуляції загоєння ран в db/db мишей

У цьому експерименті аналізували ефект IL-22 на стимуляцію або поліпшення загоєння ран і порівнювали його з VEGF. Самок BKS.Cg-Dock7<sup>m</sup> +/- Leprdb/J db/db мишей віком 11 тижнів здобували в Jackson Laboratory, Бар Харбор, Мен. Усі дослідження на експериментальних тваринах проводили зі схвалення Інституціональним комітетом з утримання та використання тварин компанії Genentech Lab Animal Research. Під анестезією ізофлураном обривали дорсальну шкіру, потім наносили крем-депіляторій для видалення щетини, що залишилися. Після цього шкіру очищали та попередньо обробляли за допомогою повідон-йоду з наступним промокуванням спиртом за допомогою тампона, робили круглу рану на всю товщину шкіри на дорсальній шкірі кожної миші за допомогою одноразового 6 мм дерматома (Miltex, Inc.). Рану закривали за допомогою плівки Tegaderm до та після обробки.

З результатів на фігурі 56 видно, що VEGF, очевидно, здійснював більш швидке закриття поверхні у порівнянні з IL-22; проте, при вивченні шкіри з боку дерми виявляли, що рани, оброблені VEGF, залишалися відкритими навіть на день 21 (фігура 56B). Також аналізували здатність VEGF і IL-22 Fc стимулювати ангиогенез на місці рани. У цьому експерименті розсікали

дві 6 мм рани в db/db мишей на день 0. На день 2, 4, 6, 8, 10 і 12 на ранах місцево застосовували або контрольне антитіло до антигена амброзії, або IL-22 Fc (50 мкг), або VEGF (20 мкг) у сольовому розчині. На день 6 і 12 трьох мишей з кожної групи забирали для гістологічного й імуногістохімічного аналізу та фарбування за допомогою BrdU. На день 16 одну мишу забирали для фарбування за допомогою BrdU. На день 18, 20 і 22 одну мишу з кожної групи забирали для кожного моменту часу для імуногістохімічного аналізу та фарбування за CD31 усієї тканини. З результатів видно, що як VEGF, так і IL-22-Fc, але не контрольне антитіло до антигена амброзії, стимулювали утворення кровоносних судин на місці рани, що виявляли за допомогою аналізу шляхом імунофарбування тканини за CD31 (дані не наведені).

Потім, ми аналізували індуковану за допомогою IL-22 й індуковану іншими членами сімейства IL-10 експресію цитокінів і хемокинів у реконструйованому епідермісі. Реконструйований епідерміс являв собою моделі тканин RHE Epiderm, які зберігали в середовищі EPI-100-NMM, придбаному в Mattek. Див. Sa et al. 2007, J. Immunol. 178:2229-2240. З результатів видно, що IL-22 помітно індукував експресію IL-8, CXCL-1, MIP 3a, DMC і MCP-1 у реконструйованому епідермісі людини, хоча також спостерігали індукцію за допомогою IL-19, IL-20 або IL-24 (фігура 57). З урахуванням ефекту IL-22 на загоєння ран, яке описано в даному документі, IL-19, IL-20 і IL-24 також можуть відігравати роль у прискоренні загоєння ран.

#### Приклад 18

IL-22 забезпечував переважаючу ефективність при обробці інфікованої рани, ніж VEGF і PDGF у моделі рани з накладеною шиною в db/db мишей

У мишачій моделі загоєння ран для великої частини закриття рани передбачене стягування, оскільки мишача шкіра дуже рухлива. Для більш точної подібності з процесом загоєння рани в людей створювали модель рани з накладеною шиною, в якій силіконове кільце приклеювали до шкіри та закріплювали за допомогою хірургічної нитки навколо рани для попередження локального стягування шкіри (див. ілюстративні зображення на фігурі 59B). Див., наприклад, Zhao et al., 2012, Wound Rep. Reg. 20:342-352, і Brubaker et al., 2013, J. Immunol., 190:1746-57. У цій моделі рани гоїлися завдяки процесам грануляції та реепітеліалізації, які подібні з процесами загоєння ран у людей. Для накладення шини на рану на одну сторону стерильної силіконової шини (Grace Bio-Labs, Inc.) наносили клей Krazy glue (Elmer's Products, Inc.) і акуратно розміщали шину навколо рани за допомогою клею на її нижній стороні так, щоб рана перебувала в центрі шини. Клей зв'язувався зі шкірою при зіткненні та служив як шина протягом усього ходу дослідження. Шину додатково фіксували на шкірі за допомогою чотирьох переривчастих хірургічних швів з мононитки з нейлону 6.0 (Ethicon, Inc.). Одержували цифрове зображення рани до покриття рани прозорою плівкою Tegaderm. Крім того, мікробна інфекція на відкритій рані може затримувати загоєння ран, а хронічні рани, такі як хронічні рани, що спостерігаються у хворих цукровим діабетом, найчастіше є інфікованими ранами.

За допомогою моделі рани з накладенням шини досліджували ефект IL-22 Fc на інфіковану рану в db/db мишей. Рани, розсічені як описано вище, у мишей дикого типу або db/db мишей заражали місцево за допомогою  $0,5 \times 10^6$  CFU,  $1 \times 10^6$  CFU (бляшкоутворюючих одиниць) або  $2 \times 10^6$  CFU *Staphylococcus aureus* через два дні після розсічення рани. Як показано на фігурі 58, в db/db мишей спостерігали затримане загоєння ран у порівнянні з мишами дикого типу, і загоєння ран у таких мишей у порівнянні з контрольними додатково затримувалося при інфікуванні рани бактеріями.

В окремих експериментах ефект IL-22, що загоєє рану, порівнювали з іншими засобами в моделі інфікованої рани з накладенням шини. Через два дні після розсічення рани поверхню рани заражали стійким до метициліну штамом *S. aureus* USA300 NRS 384 (NARSA) у кількості  $1 \times 10^6$  CFU в 30 мкл сольового розчину та знову закривали її плівкою Tegaderm. Місцеву обробку починали через 48 годин після інфікування *S. aureus* за допомогою 30 мкг або IL-22-Fc, або VEGF (№ партії 110308, Genentech), або PDGF (№ партії 0507CY420, PerproTech, Inc.) в 30 мкл сольового розчину, надалі 3 рази на тиждень. Цифрові зображення рани записували до обробки та два рази на тиждень після обробки до закриття ран. Відсоток закриття рани розраховували, виходячи із зображень рани, за допомогою ImageJ, що базується на технології java програми обробки зображень, розробленої в NIH.

Як показано на фігурі 59, IL-22 Fc стимулював більш швидке загоєння ран, ніж VEGF, при нанесенні однакової кількості сполук на інфіковані рани в моделі рани з накладенням шини, яка мала більш точну подібність із загоєнням ран у людини. Потім тестували різні дози VEGF і IL-22 Fc на інфікованих ранах. У цьому експерименті робили одну розсічену рану діаметром 6 мм із накладеною шиною в db/db мишей з рівнем глюкози в крові  $> 300$  мг/дл. Кожну рану заражали за допомогою  $1 \times 10^6$  CFU *S. aureus* USA 300. Різні дози VEGF або IL-22 Fc у сольовому розчині застосовували місцево три рази на тиждень до закриття рани. В якості контролю застосовували

сольовий розчин. Після закриття ран мишей умертвляли, а зразки піддавали гістологічному, імуногістохімічному й ПЛР аналізу та підраховували CFU. З результатів на фігурі 60 видно, що для IL-22 Fc у кількості 30 мкг спостерігали більш гарну ефективність загоєння інфікованих ран, ніж для 60 мкг VEGF. Таким чином, більш швидке закриття поверхні під дією VEGF, яке спостерігали в моделі рани без накладення шини, імовірно було обумовлено стягуванням шкіри миші, а ефекти IL-22 Fc на стимуляцію проліферації кератиноцитів і реепітелізації, очевидно, перекривалися стягуванням шкіри миші.

Аналогічні результати показані на фігурі 61, на якій продемонстровано, що IL-22 Fc мав переважаючу ефективність, у порівнянні з VEGF і PDGF, при нанесенні на рану однакової кількості (30 мкг) кожної сполуки. Повне закриття в обробленій за допомогою IL-22 Fc інфікованої рани з накладенням шини спостерігали на день 15. В оброблених за допомогою VEGF або PDGF мишей, проте, повне закриття інфікованої рани з накладенням шини не спостерігали до дня 25, рівно так само, як і в неопрацьованій неінфікованої рани. Закриття рани в контрольній групі, тобто неопрацьованій інфікованої рани, не спостерігали до дня 29. Без обмеження до конкретного механізму (механізмів), перевага IL-22 Fc у стимуляції загоєння ран, у порівнянні з VEGF або PDGF, могла бути обумовлена його ефектами на реепітелізацію, стимуляцію проліферації кератиноцитів, індукцію ревазуляризації, індукцію протеаз для полегшення ремоделювання та репарації тканин і протимікробні активності.

Потім ми тестували, чи можна IL-22 Fc застосовувати в гелеподібному складі для загоєння ран. Ілюстративний гелеподібний склад, який застосовували в такому експерименті, містив 10 mM фосфат натрію з pH 7,1 з 0,5 мг/г метіоніну та 3 % гідроксипропілметилцелюлози (HPMC E4M premium від Dow Chemicals), з або без 1 мг/г IL-22 Fc. Гель-розчин і розчин IL-22 Fc змішували перед місцевим нанесенням на рану з накладенням шини. Склад, що містив IL-22 Fc, також містив невелику кількість сахарози (< 20 mM) і P20 (< 0.002 %), які переносили з вихідного складу для білків. З результатів, показаних на фігурі 62, видно, що IL-22 Fc як у розчині, так і в гелеподібному складі стимулював загоєння у неінфікованої рани з накладенням шини.

Вважають, що опис є достатнім для того, щоб фахівець у даній області техніки зміг здійснити на практиці даний винахід. Хоча наведений вище даний винахід для повної ясності розуміння було описано досить докладно за допомогою ілюстрації та прикладу, описи та приклади не слід витлумачувати в якості обмеження об'єму даного винаходу. Фактично, з наведеного вище опису фахівцям у даній області техніки будуть очевидні різні модифікації даного винаходу, крім показаних і описаних у даному документі, і всі вони підпадають під об'єм прикладеної формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ДЖЕНЕНТЕК, ІНК.та ін.

<120> ПОЛІПЕПТИДИ ІL-22, ХИМЕРНІ БІЛКИ ІL-22 Fc ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> P5580R1-WO

<140> Призначається

<141> При цьому

<150> US 61/800148

<151> 2013-03-15

<150> US 61/800795

<151> 2013-03-15

<150> US 61/801144

<151> 2013-03-15

<150> US 61/821062

<151> 2013-05-08

<150> US 61/860176

<151> 2013-07-30

<160> 80

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 495

<212> ДНК

<213> Людина розумна

<220>

<223> Людина ІL-22

<400> 1

atgggatggt catgtatcat cttttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagcg	60
cccatcagct cccactgcag gcttgacaag tccaacttcc agcagcccta tatcaccaac	120
cgcaccttca tgctggctaa ggaggctagc ttggctgata acaacacaga cgttcgtctc	180
attggggaga aactgttcca cggagtcagt atgagtgagc gctgctatct gatgaagcag	240
gtgtgaact tcaccttga agaagtgtg ttccctcaat ctgatagggt ccagccttat	300
atgcaggagg tgggtgccctt cctggccagg ctgagcaaca ggctaagcac atgtcatatt	360
gaagggtgatg acctgcatat ccagaggaat gtgcaaaaagc tgaaggacac agtgaaaaag	420

Сторінка 1



cttggagaga gtggagagat caaagcaatt ggagaactgg atttgctggt tatgtctctg 480  
 agaaatgcct gcatt 495

<210> 2  
 <211> 165  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

<220>  
 <223> Людина IL-22

<400> 2  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn  
 20 25 30

Phe Gln Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu  
 35 40 45

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

Leu Phe His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln  
 65 70 75 80

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

Phe Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser  
 100 105 110

Asn Arg Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln  
 115 120 125

Arg Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser  
 130 135 140

Gly Glu Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu  
 145 150 155 160

Arg Asn Ala Cys Ile  
165

<210> 3  
<211> 438  
<212> ДНК  
<213> Людина розумна

<220>  
<223> IL-22 ДНК (зріла)

<400> 3  
gcgcccacatca gctcccaactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc 60  
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt 120  
ctcattgggg agaaactggt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag 180  
caggctgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct 240  
tatatgcagg aggtgggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat 300  
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag 360  
aagcttgag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct 420  
ctgagaaatg cctgcatt 438

<210> 4  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

<220>  
<223> IL-22 (зріла)

<400> 4  
Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln Gln  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ile  
145

<210> 5  
<211> 57  
<212> ДНК  
<213> Людина розумна

<220>  
<223> IL-22 лідерна послідовність

<400> 5  
atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattca 57

<210> 6  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

<220>  
<223> IL-22 лідерна послідовність

<400> 6  
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val His Ser

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1128

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна Послідовність

&lt;220&gt;

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IL-22 Fc злиття IgG4 (мінус C-термінал Lys) N297G

&lt;400&gt; 7

gcgcccacatca gctcccaactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag	180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtgggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa	360
aagcttgagg agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtcc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc	480
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact	540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac	600
cccagagtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag	660
ccgcgggagg agcagttcgg aagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc	780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc	840
ctgcccccat ccagggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa	900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	960
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaggcta	1020
accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag	1080

Сторінка 5

gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggt

1128

<210> 8

<211> 376

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (мінус C-термінал Lys) N297G

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys	Ile	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Сторінка 6

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
370 375

<210> 9

<211> 1128

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (мінус C-термінал Lys) N297A

<400> 9

gcgcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtctg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag	180
cagggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccttc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtgggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag	360
aagcttgag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc	480
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact	540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac	600
cccaggttc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	660
ccgcgggagg agcagttcgc tagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc	780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc	840
ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa	900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	960
tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta	1020

accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1080  
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggt 1128

<210> 10  
<211> 376  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>  
<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (мінус C-термінал Lys) N297A

<400> 10  
Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln Gln  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
370 375

<210> 11

<211> 1131

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>

<223> IL-22 Fc элиття IgG1 (мінус C-термінал Lys) N297G

<400> 11

gcgcccatca gctcccaactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag	180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagt ctgttcctc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtgggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa	360
aagcttgagg agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattga gcccaaact agtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc	480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac	540
accctcatga tctcccgga cctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa	600
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	660
aagccgcggg aggagcagta cggaagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaaca agccctcca	780
gccccatcg agaaaaccat ctcaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac	840
accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	900
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac	960

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1020  
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1080  
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg t 1131

<210> 12

<211> 377

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (мінус C-термінал Lys) N297G

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Сторінка 12

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
370 375

<210> 13  
<211> 1131  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>  
<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (мінус C-термінал Lys) N297A

<400> 13  
gcgcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc 60  
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt 120  
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag 180  
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct 240  
tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat 300  
attgaagggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa 360  
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct 420  
ctgagaaatg cctgcattga gccc aaatct agtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 480  
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 540  
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 600  
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 660  
aagccgcggg aggagcagta cgctagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 720  
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 780  
gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 840  
accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 900

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 960  
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag 1020  
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1080  
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg t 1131

<210> 14

<211> 377

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (мінус C-термінал Lys) N297A

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
370 375

<210> 15

<211> 1131

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (повний) N297G

<400> 15

gcgcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag	180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa	360
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtcc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc	480
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact	540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac	600
cccgagggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	660
ccgcgggagg agcagttcgg aagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgctc	780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc	840



```

ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa      900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac      960
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta     1020
accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag     1080
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa a              1131

```

<210> 16

<211> 377

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (повний) N297G

<400> 16

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile

```

Сторінка 18

115	120	125
Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp	Leu Leu Phe Met Ser	Leu Arg Asn Ala
130	135	140
Cys Ile Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro	Pro Cys Pro Pro Cys Pro	
145	150	155
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
	165	170
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys Val	
	180	185
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr		
	195	200
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
	210	215
Gln Phe Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
	225	230
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
	245	250
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
	260	265
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met		
	275	280
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
	290	295
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
	305	310
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
	325	330

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
370 375

<210> 17

<211> 1131

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (повний) N297A

<400> 17

gcgcccacatca gctcccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggctg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag	180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccttc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaag	360
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtcc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc	480
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact	540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac	600
cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	660
ccgcgggagg agcagttcgc tagcacgtac cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac	720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc	780

```
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 840
ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 960
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta 1020
accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1080
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa a 1131
```

<210> 18

<211> 377

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (повний) N297A

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Сторінка 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
370 375

<210> 19

<211> 1134

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (повний) N297G

<400> 19

gcgcccacatca gctcccaactg caggcttgac aagtcacaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag	180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaagtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa	360
aagcttgagg agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattga gcccaaact agtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc	480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac	540
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa	600
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	660
aagccgcggg aggagcagta cggaagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	720

caccaggact ggctgaatgg caaggagtag aagtgaagg tctccaacaa agccctccca 780  
 gcccccatcg agaaaaccat ctcaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 840  
 accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 900  
 aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 960  
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag 1020  
 ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1080  
 gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1134

<210> 20

<211> 378

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (повний) N297G

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

Сторінка 24

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



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

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

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

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

<210> 21  
<211> 1134  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>  
<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (повний) N297A

<400> 21  
gcgcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc 60  
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt 120  
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag 180  
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct 240  
tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat 300  
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa 360  
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct 420  
ctgagaaatg cctgcattga gcccaaactt agtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc 480  
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 540  
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgttg tggaggacgt gagccacgaa 600  
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgttg aggtgcataa tgccaagaca 660

```

aagccgcggg aggagcagta cgctagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtag aagtgaagg tctccaacaa agccctccca      780
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac      840
accctgcccc catcccggga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      900
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac      960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag     1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat     1080
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa             1134

```

<210> 22

<211> 378

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (повний) N297A

<400> 22

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

Сторінка 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 1128

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (wt N297, мінус Lys)

<400> 23

gcgcccatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggctg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag	180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa	360
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc	480
gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact	540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac	600

```

cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag      660
ccgcggggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac      720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc      780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc      840
ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa      900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac      960
tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaggcta     1020
accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag     1080
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggt      1128

```

<210> 24

<211> 376

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (wt N297, мінус Lys)

<400> 24

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

Сторінка 30

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

Сторінка 31

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
370 375

<210> 25

<211> 1131

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (wt N297, мінус Lys)

<400> 25

gcgcccatca gctcccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag	180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttccttc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtgggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaagtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa	360
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattga gcccaaactc agtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac	540

```

accctcatga tctccccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa      600
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      660
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca      780
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac      840
accctgcccc catcccggga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      900
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagggggaga gcaatgggca gccggagaac      960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag     1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat     1080
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg t              1131

```

<210> 26

<211> 377

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc элиття IgG1 (wt N297, мінус Lys)

<400> 26

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```



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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
370 375

<210> 27

<211> 1131

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (N297 wt)

<400> 27

gcgcccacatca gctcccaactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc	60
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt	120
ctcattgggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag	180
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct	240
tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat	300
attgaaggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa	360
aagcttgag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct	420
ctgagaaatg cctgcattcg cgttgagtc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc	480

```

gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact 540
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac 600
cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 660
ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 720
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgtcc 780
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 840
ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 900
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 960
tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaggcta 1020
accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1080
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa a 1131

```

<210> 28

<211> 377

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG4 (N297 wt)

<400> 28

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

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

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

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

Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Сторінка 36

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
370 375

<210> 29  
<211> 1134  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
полінуклеотид

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

<400> 29  
gcgcccacatca gctccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc 60  
aaccgcacct tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt 120  
ctcattggggg agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgctgcta tctgatgaag 180  
caggtgctga acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct 240  
tatatgcagg aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat 300  
attgaagggtg atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa 360  
aagcttggag agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct 420

```

ctgagaaatg cctgcattga gcccaaattct agtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc      480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac      540
accctcatga tctcccgga ccttgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa      600
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      660
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca      780
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac      840
accctgcccc catcccgga agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      900
aaaggcttct atcccagcga catgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac      960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag     1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat     1080
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taata          1134

```

<210> 30

<211> 378

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG1 (N297 wt)

<400> 30

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний шарнірний пептид

<400> 31

Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний лінкерний пептид

<400> 32

Asp Lys Thr His Thr



1

5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 33

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

1

5

10

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 34

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

1

5

10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 35

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

1

5

10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

Сторінка 42

<400> 36

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

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 37

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

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 38

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

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 39

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

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 40

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

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 41

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr  
1 5

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний (IgG3) пептид

<400> 42

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

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 43

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність  
  
 <220>  
 <223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
 лінкерний пептид  
  
 <400> 44  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 1 5  
  
 <210> 45  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність  
  
 <220>  
 <223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
 лінкерний пептид  
  
 <400> 45  
 Gly Gly Ser  
 1  
  
 <210> 46  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність  
  
 <220>  
 <223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
 лінкерний пептид  
  
 <400> 46  
 Gly Gly Gly Ser  
 1  
  
 <210> 47  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність  
  
 <220>  
 <223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
 лінкерний пептид  
  
 <400> 47  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 48  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> Pan troglodytes

<400> 48  
 Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Ser Phe Gln Gln  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ile  
 145

<210> 49  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> Pongo abelii

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ile  
145

<210> 50  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 50  
Leu Pro Val Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln Gln  
1 5 10 15

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

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

Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn  
50 55 60

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

Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu  
85 90 95

Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn Val  
100 105 110

Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile  
115 120 125

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

Cys Val  
145

<210> 51  
<211> 146  
<212> PRT  
<213> Canis familiaris

<400> 51  
Leu Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln Gln  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Val  
145

<210> 52  
<211> 94  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
IL-22 Fc злиття білка IgG1 прямим праймером

<400> 52  
ttgaattcca ccatgggatg gtcattgtatc atcctttttc tagtagcaac tgcaactgga 60  
gtacattcag cgcccatcag ctcccaactgc aggc 94

<210> 53  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
IL-22 Fc злиття IgG1 зворотнім праймером

<400> 53  
aggctgactc atttaccgag agacaggag agg 33



<210> 54	
<211> 94	
<212> ДНК	
<213> Штучна Послідовність	
<220>	
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний IL-22 Fc злиття IgG4 прямим праймером	
<400> 54	
ttgaattcca ccatgggatg gtcattgtatc atcctttttc tagtagcaac tgcaactgga	60
gtacattcag cgcccatcag ctcccactgc aggc	94
<210> 55	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> Штучна Послідовність	
<220>	
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний IL-22 Fc злиття IgG4 зворотнім праймером	
<400> 55	
aggtcgactt atttaccag agacaggag agg	33
<210> 56	
<211> 35	
<212> ДНК	
<213> Штучна Послідовність	
<220>	
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний IgG1 N297G прямий праймер	
<400> 56	
gcgggaggag cagtacgga gacgtaccg tgtgg	35
<210> 57	
<211> 35	
<212> ДНК	
<213> Штучна Послідовність	
<220>	
<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний IgG1 N297G зворотній праймер	
<400> 57	
ccacacggta cgtgcttcg tactgtcct cccgc	35

<210> 58

<211> 51

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
IgG4 N297G прямий праймер

<400> 58

асааагсccgc gggaggagca gttcggaagc acgtaccgtg tggtcagcgt c 51

<210> 59

<211> 51

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
IgG4 N297G зворотній праймер

<400> 59

gacgctgacc acacggtacg tgcttccgaa ctgctcctcc cgcggctttg t 51

<210> 60

<211> 411

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 Fc злиття IgG2a

<400> 60

Met	Ala	Val	Leu	Gln	Lys	Ser	Met	Ser	Phe	Ser	Leu	Met	Gly	Thr	Leu
1				5					10					15	

Ala	Ala	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Trp	Ala	Gln	Glu	Ala	Asn
			20					25					30		

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

Сторінка 51

Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser  
50 55 60

Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe  
65 70 75 80

Arg Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu  
85 90 95

Asn Phe Thr Leu Glu Asp Val Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln  
100 105 110

Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln  
115 120 125

Leu Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn  
130 135 140

Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu  
145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn  
165 170 175

Ala Cys Val Ala Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys  
180 185 190

Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
195 200 205

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr  
210 215 220

Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser  
225 230 235 240

Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His  
245 250 255

Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile

260	265	270
Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn		
275	280	285
Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys		
290	295	300
Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu		
305	310	315
Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe		
325	330	335
Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu		
340	345	350
Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr		
355	360	365
Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg		
370	375	380
Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His		
385	390	395
Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys		
405	410	

<210> 61

<211> 372

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> IL-22 IgG1 злиття ручки (T366W) мінус Lys

<400> 61

Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln Gln

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
225 230 235 240

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
245 250 255

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

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

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
290 295 300

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
305 310 315 320

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
340 345 350

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

Leu Ser Pro Gly  
370

<210> 62

<211> 226

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
поліпептид

<220>

<223> Мономерний Fc отвір

&lt;400&gt; 62

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

Сторінка 56

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly  
 225

<210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
 лінкерний пептид

<400> 63  
 Gly Gly Gly Ser Thr His Thr  
 1 5

<210> 64  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
 лінкерний пептид

<400> 64  
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
 1 5 10

<210> 65  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
 лінкерний пептид

<400> 65  
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr  
 1 5 10 15

<210> 66  
 <211> 13



<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 66

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

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 67

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

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 68

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

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Опис Штучної Послідовності: Синтетичний  
лінкерний пептид

<400> 69

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

<210> 70  
 <211> 1152  
 <212> ДНК  
 <213> Людина розумна

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (58)..(597)

<400> 70  
 cttcagaaca ggttctcctt cccagtcac cagttgctcg agttagaatt gtctgca 57  
  
 atg gcc gcc ctg cag aaa tct gtg agc tct ttc ctt atg ggg acc ctg 105  
 Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu  
 1 5 10 15  
  
 gcc acc agc tgc ctc ctt ctc ttg gcc ctc ttg gta cag gga gga gca 153  
 Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala  
 20 25 30  
  
 gct gcg ccc atc agc tcc cac tgc agg ctt gac aag tcc aac ttc cag 201  
 Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln  
 35 40 45  
  
 cag ccc tat atc acc aac cgc acc ttc atg ctg gct aag gag gct agc 249  
 Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser  
 50 55 60  
  
 ttg gct gat aac aac aca gac gtt cgt ctc att ggg gag aaa ctg ttc 297  
 Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe  
 65 70 75 80  
  
 cac gga gtc agt atg agt gag cgc tgc tat ctg atg aag cag gtg ctg 345  
 His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu  
 85 90 95  
  
 aac ttc acc ctt gaa gaa gtg ctg ttc cct caa tct gat agg ttc cag 393  
 Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln  
 100 105 110  
  
 cct tat atg cag gag gtg gtg ccc ttc ctg gcc agg ctc agc aac agg 441  
 Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg  
 115 120 125  
  
 cta agc aca tgt cat att gaa ggt gat gac ctg cat atc cag agg aat 489  
 Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn  
 130 135 140  
  
 gtg caa aag ctg aag gac aca gtg aaa aag ctt gga gag agt gga gag 537  
 Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu  
 145 150 155 160

atc aaa gca att gga gaa ctg gat ttg ctg ttt atg tct ctg aga aat 585  
Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn  
165 170 175

gcc tgc att tga ccagagcaaa gctgaaaaat gaataactaa ccccttttcc 637  
Ala Cys Ile

ctgctagaaa taacaattag atgccccaaa gcgatttttt ttaacccaaaa ggaagatggg 697

aagccaaact ccatcatgat ggggtggattc caaatgaacc cctgcgttag ttacaaagga 757

aaccaatgcc acttttgttt ataagaccag aaggtagact ttctaagcat agatatttat 817

tgataacatt tcattgtaac tgggtgttcta tacacagaaa acaattttatt ttttaaataa 877

ttgtcttttt ccataaaaaa gattactttc cattccttta ggggaaaaaaa cccctaaata 937

gcttcatgtt tccataatca gtactttata tttataaatg tatttattat tattataaga 997

ctgcatttta tttatatcat tttattaata tggattttatt tatagaaaca tcattcgata 1057

ttgctacttg agtgaaggc taatattgat atttatgaca ataattatag agctataaca 1117

tgttttattg acctcaataa acacttggat atccc 1152

<210> 71

<211> 179

<212> PRT

<213> Людина розумна

<400> 71

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu  
1 5 10 15

Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala  
20 25 30

Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln  
35 40 45

Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser  
50 55 60

Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe  
65 70 75 80

Сторінка 60

His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu  
85 90 95

Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln  
100 105 110

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

Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn  
130 135 140

Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu  
145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn  
165 170 175

Ala Cys Ile

<210> 72  
<211> 1236  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Синтетичний поліпептид

<400> 72  
atggctgtcc tgcagaaatc tatgagtttt tcccttatgg ggactttggc cgccagctgc 60  
ctgcttctca ttgccctgtg ggcccaggag gcaaatgcgc tgcccgtaa caccgggtgc 120  
aagcttgagg tgtccaactt ccagcagcca tacatcgtca accgcacctt tatgctggcc 180  
aaggaggcca gccttgcaga taacaacaca gatgtccggc tcatcgggga gaaactgttc 240  
cgaggagtca gtgctaagga tcagtgttac ctgatgaagc aggtgctcaa cttcaccctg 300  
gaagacgttc tgctcccca gtcagacagg ttccagccct acatgcagga ggtgggtgcct 360  
ttcctgacca aactcagcaa tcagctcagc tcctgtcaca tcagcgggtga cgaccagaac 420  
atccagaaga atgtcagaag gctgaaggag acagtgaaaa agcttgagga gagtggagag 480

Сторінка 61

```

atcaaggcga ttggggaact ggacctgctg tttatgtctc tgagaaatgc ttgcgtcgct      540
cgaggaccca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt      600
ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc      660
cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc      720
tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gctcagacac aaacccatag agaggattac      780
aacagtactc tacgcgtggt cagtgccttc cccatccagc accaggactg gatgagtggc      840
aaggagttca aatgcaaggt caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc      900
tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca caggtatatg tcttgcctcc accagaagaa      960
gagatgacta agaaacaggt cactctgacc tgcatgggtc cagacttcat gcctgaagac     1020
atttacgtgg agtggacca caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca     1080
gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac     1140
tggggtggaaa gaaatagcta ctctgttca gtggtccacg agggctctgca caatcaccac     1200
acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aaatga                                1236

```

<210> 73  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний поліпептид

<400> 73

Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu  
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn  
 20 25 30

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

Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser  
 50 55 60

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

Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn  
275 280 285

Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys  
290 295 300

Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu  
305 310 315 320

Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe  
325 330 335

Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu  
340 345 350

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

Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg  
370 375 380

Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His  
385 390 395 400

Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
405 410

<210> 74  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Синтетичний праймер

<400> 74  
aggtccattc agatgctggt

20

<210> 75  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 75  
 taggtgtggt tgacgtggag 20

<210> 76  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Синтетичний праймер

<400> 76  
 ссассссаса стсасассgg 20

<210> 77  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> Людина розумна

<400> 77

Met Lys Leu Gln Cys Val Ser Leu Trp Leu Leu Gly Thr Ile Leu Ile  
 1 5 10 15

Leu Cys Ser Val Asp Asn His Gly Leu Arg Arg Cys Leu Ile Ser Thr  
 20 25 30

Asp Met His His Ile Glu Glu Ser Phe Gln Glu Ile Lys Arg Ala Ile  
 35 40 45

Gln Ala Lys Asp Thr Phe Pro Asn Val Thr Ile Leu Ser Thr Leu Glu  
 50 55 60

Thr Leu Gln Ile Ile Lys Pro Leu Asp Val Cys Cys Val Thr Lys Asn  
 65 70 75 80

Leu Leu Ala Phe Tyr Val Asp Arg Val Phe Lys Asp His Gln Glu Pro  
 85 90 95

Asn Pro Lys Ile Leu Arg Lys Ile Ser Ser Ile Ala Asn Ser Phe Leu  
 100 105 110



Tyr Met Gln Lys Thr Leu Arg Gln Cys Gln Glu Gln Arg Gln Cys His  
115 120 125

Cys Arg Gln Glu Ala Thr Asn Ala Thr Arg Val Ile His Asp Asn Tyr  
130 135 140

Asp Gln Leu Glu Val His Ala Ala Ala Ile Lys Ser Leu Gly Glu Leu  
145 150 155 160

Asp Val Phe Leu Ala Trp Ile Asn Lys Asn His Glu Val Met Ser Ser  
165 170 175

Ala

<210> 78  
<211> 176  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

<400> 78

Met Lys Ala Ser Ser Leu Ala Phe Ser Leu Leu Ser Ala Ala Phe Tyr  
1 5 10 15

Leu Leu Trp Thr Pro Ser Thr Gly Leu Lys Thr Leu Asn Leu Gly Ser  
20 25 30

Cys Val Ile Ala Thr Asn Leu Gln Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Glu  
35 40 45

Ile Arg Gly Ser Val Gln Ala Lys Asp Gly Asn Ile Asp Ile Arg Ile  
50 55 60

Leu Arg Arg Thr Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Pro Ala Asn Arg Cys  
65 70 75 80

Cys Leu Leu Arg His Leu Leu Arg Leu Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys  
85 90 95

Asn Tyr Gln Thr Pro Asp His Tyr Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu  
100 105 110

Сторінка 66

Ala Asn Ser Phe Leu Thr Ile Lys Lys Asp Leu Arg Leu Cys His Ala  
115 120 125

His Met Thr Cys His Cys Gly Glu Glu Ala Met Lys Lys Tyr Ser Gln  
130 135 140

Ile Leu Ser His Phe Glu Lys Leu Glu Pro Gln Ala Ala Val Val Lys  
145 150 155 160

Ala Leu Gly Glu Leu Asp Ile Leu Leu Gln Trp Met Glu Glu Thr Glu  
165 170 175

<210> 79

<211> 207

<212> PRT

<213> Людина розумна

<400> 79

Met Asn Phe Gln Gln Arg Leu Gln Ser Leu Trp Thr Leu Ala Ser Arg  
1 5 10 15

Pro Phe Cys Pro Pro Leu Leu Ala Thr Ala Ser Gln Met Gln Met Val  
20 25 30

Val Leu Pro Cys Leu Gly Phe Thr Leu Leu Leu Trp Ser Gln Val Ser  
35 40 45

Gly Ala Gln Gly Gln Glu Phe His Phe Gly Pro Cys Gln Val Lys Gly  
50 55 60

Val Val Pro Gln Lys Leu Trp Glu Ala Phe Trp Ala Val Lys Asp Thr  
65 70 75 80

Met Gln Ala Gln Asp Asn Ile Thr Ser Ala Arg Leu Leu Gln Gln Glu  
85 90 95

Val Leu Gln Asn Val Ser Asp Ala Glu Ser Cys Tyr Leu Val His Thr  
100 105 110

Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Lys Thr Val Phe Lys Asn Tyr His Asn Arg  
115 120 125

Thr Val Glu Val Arg Thr Leu Lys Ser Phe Ser Thr Leu Ala Asn Asn  
130 135 140

Phe Val Leu Ile Val Ser Gln Leu Gln Pro Ser Gln Glu Asn Glu Met  
145 150 155 160

Phe Ser Ile Arg Asp Ser Ala His Arg Arg Phe Leu Leu Phe Arg Arg  
165 170 175

Ala Phe Lys Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Leu Gly  
180 185 190

Glu Val Asp Ile Leu Leu Thr Trp Met Gln Lys Phe Tyr Lys Leu  
195 200 205

<210> 80  
<211> 171  
<212> PRT  
<213> Людина розумна

<400> 80

Met Leu Val Asn Phe Ile Leu Arg Cys Gly Leu Leu Leu Val Thr Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Ala Ile Ala Lys His Lys Gln Ser Ser Phe Thr Lys Ser Cys  
20 25 30

Tyr Pro Arg Gly Thr Leu Ser Gln Ala Val Asp Ala Leu Tyr Ile Lys  
35 40 45

Ala Ala Trp Leu Lys Ala Thr Ile Pro Glu Asp Arg Ile Lys Asn Ile  
50 55 60

Arg Leu Leu Lys Lys Lys Thr Lys Lys Gln Phe Met Lys Asn Cys Gln  
65 70 75 80

Phe Gln Glu Gln Leu Leu Ser Phe Phe Met Glu Asp Val Phe Gly Gln  
85 90 95

Сторінка 68

Leu Gln Leu Gln Gly Cys Lys Lys Ile Arg Phe Val Glu Asp Phe His  
 100 105 110

Ser Leu Arg Gln Lys Leu Ser His Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ser Ala  
 115 120 125

Arg Glu Met Lys Ser Ile Thr Arg Met Lys Arg Ile Phe Tyr Arg Ile  
 130 135 140

Gly Asn Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Ile Ser Glu Leu Asp Ile Leu Leu  
 145 150 155 160

Ser Trp Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser Ser Gln  
 165 170

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Химерний білок інтерлейкін (IL)-22 Fc, який зв'язується з рецептором IL-22, при цьому зазначений химерний білок IL-22 Fc містить поліпептид IL-22, з'єднаний з Fc-ділянкою за допомогою лінкера, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8, причому амінокислотний залишок Fc-ділянки у положенні 297 за EU-нумерацією являє собою Gly або Ala, і причому Fc-ділянка не є глікозилованою.
2. Химерний білок IL-22 Fc за п. 1, причому амінокислотна послідовність щонайменше на 96 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8.
3. Химерний білок IL-22 Fc за п. 1 або п. 2, причому амінокислотна послідовність щонайменше на 97 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8.
4. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-3, причому амінокислотна послідовність щонайменше на 98 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8.
5. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-4, причому амінокислотна послідовність щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8.
6. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-5, причому химерний білок IL-22 Fc отриманий згідно зі способом, який включає етап культивування клітини-хазяїна, здатної експресувати химерний білок IL-22 Fc, в умовах, що підходять для експресії химерного білка IL-22 Fc.
7. Химерний білок IL-22 Fc за п. 6, причому спосіб додатково включає етап одержання химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища.
8. Химерний білок IL-22 Fc за п. 6 або п. 7, причому клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.
9. Химерний білок IL-22 Fc, що містить поліпептид IL-22, з'єднаний з Fc-ділянкою IgG за допомогою лінкера, причому Fc-ділянка містить шарнірну ділянку, домен CH2 IgG4 і домен CH3 IgG4, причому амінокислотний залишок Fc-ділянки у положенні 297 за EU-нумерацією являє собою Gly або Ala, і причому Fc-ділянка не є глікозилованою.
10. Химерний білок IL-22 Fc за п. 9, причому шарнірна ділянка містить амінокислотну послідовність CPPCP (SEQ ID NO:31).
11. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-8, причому Fc-ділянка являє собою Fc-ділянку IgG4.
12. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-11, причому лінкер містить амінокислотну послідовність SKYGPP (SEQ ID NO:43).
13. Химерний білок IL-22 Fc за п. 12, причому лінкер містить амінокислотну послідовність RVESKYGPP (SEQ ID NO:44).
14. Химерний білок IL-22 Fc, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
15. Химерний білок IL-22 Fc, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
16. Химерний білок IL-22 Fc, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.
17. Химерний білок IL-22 Fc, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:8.
18. Химерний білок IL-22 Fc, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:10.
19. Химерний білок IL-22 Fc, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:16.
20. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 9-19, причому химерний білок IL-22 Fc отриманий згідно зі способом, який включає етап культивування клітини-хазяїна, здатної експресувати химерний білок IL-22 Fc в умовах, що підходять для експресії химерного білка IL-22 Fc.
21. Химерний білок IL-22 Fc за п. 20, причому спосіб додатково включає етап одержання химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища.
22. Химерний білок IL-22 Fc за п. 20 або п. 21, причому клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.
23. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-22, причому химерний білок IL-22 являє собою димерний химерний білок IL-22 Fc.
24. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-22, причому химерний білок IL-22 являє собою мономерний химерний білок IL-22 Fc.
25. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-24, причому поліпептид IL-22 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4.
26. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-25, причому поліпептид IL-22 являє собою людський поліпептид IL-22.
27. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 9-26, причому химерний білок IL-22 зв'язується з рецептором IL-22.
28. Химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-8 або п. 27, причому рецептор IL-22 являє собою людський рецептор IL-22.
29. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28.

30. Виділена нуклеїнова кислота за п. 29, причому нуклеїнова кислота кодує химерний білок IL-22 Fc, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
31. Виділена нуклеїнова кислота за п. 29, причому нуклеїнова кислота кодує химерний білок IL-22 Fc, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
- 5 32. Виділена нуклеїнова кислота за п. 29, причому нуклеїнова кислота кодує химерний білок IL-22 Fc, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.
33. Виділена нуклеїнова кислота за п. 29 або п. 30, що містить полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:7.
34. Виділена нуклеїнова кислота за п. 29 або п. 31, що містить полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:9.
- 10 35. Виділена нуклеїнова кислота за п. 29 або п. 32, що містить полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:15.
36. Вектор, що містить нуклеїнову кислоту за будь-яким із пп. 29-35.
37. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 36.
- 15 38. Клітина-хазяїн за п. 37, причому клітина-хазяїн являє собою прокаріотичну клітину або еукаріотичну клітину.
39. Клітина-хазяїн за п. 38, причому клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli* або клітину CHO.
40. Клітина-хазяїн за п. 39, причому клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.
41. Спосіб одержання химерного білка IL-22 Fc, який включає етап культивування клітини-хазяїна за будь-яким із пп. 37-40 в умовах, що підходять для експресії химерного білка IL-22 Fc.
- 20 42. Спосіб за п. 41, який додатково включає етап одержання химерного білка IL-22 Fc з культури клітин або культурального середовища.
43. Спосіб за п. 41 або п. 42, у якому клітина-хазяїн являє собою клітину *E. coli*.
44. Спосіб за п. 41 або п. 42, у якому клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.
- 25 45. Фармацевтична композиція, яка містить химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій.
46. Фармацевтична композиція за п. 45, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
47. Фармацевтична композиція за п. 45, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
- 30 48. Фармацевтична композиція за п. 45, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.
49. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 45-48, причому химерний білок IL-22 Fc вироблений у клітині CHO.
- 35 50. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 45-49, яка додатково містить додатковий терапевтичний засіб.
51. Фармацевтична композиція, яка містить химерний білок IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій, причому фармацевтично прийнятний носій являє собою гелеутворюючий засіб.
- 40 52. Фармацевтична композиція за п. 51, причому гелеутворюючий засіб являє собою полісахарид.
53. Фармацевтична композиція за п. 51 або п. 52, причому гелеутворюючий засіб являє собою целюлозний засіб.
54. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 51-53, причому гелеутворюючий засіб являє собою метилцелюлозу, гідроксietилцелюлозу, карбоксиметилцелюлозу, гідроксипропілцелюлозу, блок-співполімер POE-POP, альгінат, гіалуронову кислоту, поліакрилову кислоту, гідроксietилметилцелюлозу або гідроксипропілметилцелюлозу.
- 45 55. Фармацевтична композиція за п. 54, причому гелеутворюючий засіб являє собою гідроксипропілметилцелюлозу.
- 50 56. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 51-55, причому фармацевтична композиція призначена для місцевого застосування.
57. Застосування фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 45-50 або химерного білка IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 для лікування запального захворювання кишечника (IBD) у суб'єкта, що потребує цього.
- 55 58. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування IBD у суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
59. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування IBD у суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
- 60 60. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування IBD у суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.

61. Застосування за будь-яким із пп. 57-60, у якому IBD являє собою виразковий коліт.
62. Застосування за будь-яким із пп. 57-60, у якому IBD являє собою хворобу Крона.
63. Застосування фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 45-50 або химерного білка IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 для інгібування мікробної інфекції в кишечнику, збереження келихоподібних клітин у кишечнику при мікробній інфекції, підвищення цілісності епітеліальних клітин, проліферації епітеліальних клітин, диференціювання епітеліальних клітин, міграції епітеліальних клітин або загоєння епітеліальних ран у кишечнику в суб'єкта, що потребує цього.
- 5 64. Застосування химерного білка IL-22 Fc для інгібування мікробної інфекції в кишечнику, збереження келихоподібних клітин у кишечнику при мікробній інфекції, підвищення цілісності епітеліальних клітин, проліферації епітеліальних клітин, диференціювання епітеліальних клітин, міграції епітеліальних клітин або загоєння епітеліальних ран у кишечнику в суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
- 10 65. Застосування химерного білка IL-22 Fc для інгібування мікробної інфекції в кишечнику, збереження келихоподібних клітин у кишечнику при мікробній інфекції, підвищення цілісності епітеліальних клітин, проліферації епітеліальних клітин, диференціювання епітеліальних клітин, міграції епітеліальних клітин або загоєння епітеліальних ран у кишечнику в суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
- 15 66. Застосування химерного білка IL-22 Fc для інгібування мікробної інфекції в кишечнику, збереження келихоподібних клітин у кишечнику при мікробній інфекції, підвищення цілісності епітеліальних клітин, проліферації епітеліальних клітин, диференціювання епітеліальних клітин, міграції епітеліальних клітин або загоєння епітеліальних ран у кишечнику в суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.
- 20 67. Застосування за будь-яким із пп. 63-66, у якому епітеліальна клітина являє собою кишкову епітеліальну клітину.
- 25 68. Застосування фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 45-50 або химерного білка IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 для лікування гострого ушкодження нирок або гострого панкреатиту в суб'єкта, що потребує цього.
- 30 69. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування гострого ушкодження нирок або гострого панкреатиту в суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
- 35 70. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування гострого ушкодження нирок або гострого панкреатиту в суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
- 40 71. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування гострого ушкодження нирок або гострого панкреатиту в суб'єкта, що потребує цього, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.
- 45 72. Застосування за будь-яким із пп. 57-71, у якому суб'єкту треба одночасно вводити щонайменше один додатковий терапевтичний засіб.
- 50 73. Застосування за будь-яким із пп. 57-72, у якому фармацевтичну композицію або химерний білок IL-22 Fc треба вводити внутрішньовенно, підшкірно або внутрішньочеревинно.
- 55 74. Застосування фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 45-56 або химерного білка IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 для прискорення або поліпшення загоєння ран у суб'єкта.
- 60 75. Застосування химерного білка IL-22 Fc для прискорення або поліпшення загоєння ран у суб'єкта, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
76. Застосування химерного білка IL-22 Fc для прискорення або поліпшення загоєння ран у суб'єкта, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
77. Застосування химерного білка IL-22 Fc для прискорення або поліпшення загоєння ран у суб'єкта, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.
78. Застосування за будь-яким із пп. 74-77, у якому рана являє собою хронічну рану або інфіковану рану.
79. Застосування за будь-яким із пп. 74-78, у якому суб'єкт страждає на цукровий діабет.
80. Застосування за п. 79, у якому страждаючий на цукровий діабет суб'єкт має цукровий діабет II типу.
81. Застосування за будь-яким із пп. 74-80, у якому рана являє собою виразку діабетичної стопи.
82. Застосування за будь-яким із пп. 74-81, у якому фармацевтичну композицію або химерний білок IL-22 Fc треба вводити до повного закриття рани.

83. Застосування за будь-яким із пп. 74-82, у якому суб'єкту треба одночасно вводити щонайменше один додатковий терапевтичний засіб для прискорення або поліпшення загоєння ран.
84. Застосування за будь-яким із пп. 74-83, у якому фармацевтичну композицію або химерний білок IL-22 Fc треба вводити внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньочеревинно або застосовують місцево.
85. Застосування за п. 84, у якому фармацевтичну композицію або химерний білок IL-22 Fc треба вводити місцево.
86. Застосування фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 45-50 або химерного білка IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 для попередження або лікування серцево-судинного стану, причому стан включає патологію з формуванням атеросклеротичних бляшок.
87. Застосування химерного білка IL-22 Fc для попередження або лікування серцево-судинного стану, причому стан включає патологію з формуванням атеросклеротичних бляшок, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
88. Застосування химерного білка IL-22 Fc для попередження або лікування серцево-судинного стану, причому стан включає патологію з формуванням атеросклеротичних бляшок, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
89. Застосування химерного білка IL-22 Fc для попередження або лікування серцево-судинного стану, причому стан включає патологію з формуванням атеросклеротичних бляшок, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.
90. Застосування за будь-яким із пп. 86-89, у якому серцево-судинний стан вибраний з групи, що складається з хвороби коронарних артерій, коронарного мікросудинного захворювання, інсульту, захворювання сонної артерії, захворювання периферичних артерій і хронічного захворювання нирок.
91. Застосування за будь-яким із пп. 86-90, яке додатково включає вповільнення прогресування формування атеросклеротичних бляшок або попередження прояву ознаки атеросклерозу.
92. Застосування за п. 91, у якому ознака атеросклерозу включає скупчення бляшок або запалення судин.
93. Застосування за пп. 86-92, у якому суб'єкт був виявлений як підданий ризику розвитку серцево-судинного стану.
94. Застосування фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 45-50 або химерного білка IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 для лікування метаболічного синдрому.
95. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування метаболічного синдрому, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
96. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування метаболічного синдрому, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.
97. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування метаболічного синдрому, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.
98. Застосування за будь-яким із пп. 94-97, яке додатково включає зменшення одного або декількох факторів ризику, асоційованих із метаболічним синдромом, у тому числі одного або декількох із центрального ожиріння, гіперглікемії, дисліпідемії та гіпертонії.
99. Застосування за будь-яким із пп. 94-98, яке додатково включає зменшення рівня бактеріального ліпополісахариду (LPS) у суб'єкта.
100. Застосування за будь-яким із пп. 94-99, у якому суб'єкт потребує зміни ліпідного профілю HDL/LDL.
101. Застосування за будь-яким із пп. 86-100, у якому суб'єкту треба одночасно вводити щонайменше один додатковий терапевтичний засіб.
102. Застосування за будь-яким із пп. 86-101, у якому фармацевтичну композицію або химерний білок IL-22 Fc треба вводити внутрішньовенно, підшкірно або внутрішньочеревинно.
103. Застосування фармацевтичної композиції за будь-яким із пп. 45-50 або химерного білка IL-22 Fc за будь-яким із пп. 1-28 для лікування гострого ендотоксикозу, сепсису або як першого, так і другого.
104. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування гострого ендотоксикозу, сепсису або як першого, так і другого, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8.
105. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування гострого ендотоксикозу, сепсису або як першого, так і другого, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.



106. Застосування химерного білка IL-22 Fc для лікування гострого ендотоксикозу, сепсису або як першого, так і другого, причому химерний білок IL-22 Fc містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16.

5 107. Застосування за будь-яким із пп. 103-106, у якому суб'єкт потребує зміни ліпідного профілю HDL/LDL.

108. Застосування за будь-яким із пп. 103-107, у якому суб'єкту треба одночасно вводити щонайменше один додатковий терапевтичний засіб для лікування гострого ендотоксикозу, сепсису або як першого, так і другого.

10 109. Застосування за будь-яким із пп. 103-108, у якому фармацевтичну композицію або химерний білок IL-22 Fc треба вводити внутрішньовенно, підшкірно або внутрішньочеревинно.

110. Застосування за будь-яким із пп. 57-84 або 86-109, у якому фармацевтичну композицію або химерний білок IL-22 Fc треба вводити внутрішньовенно.

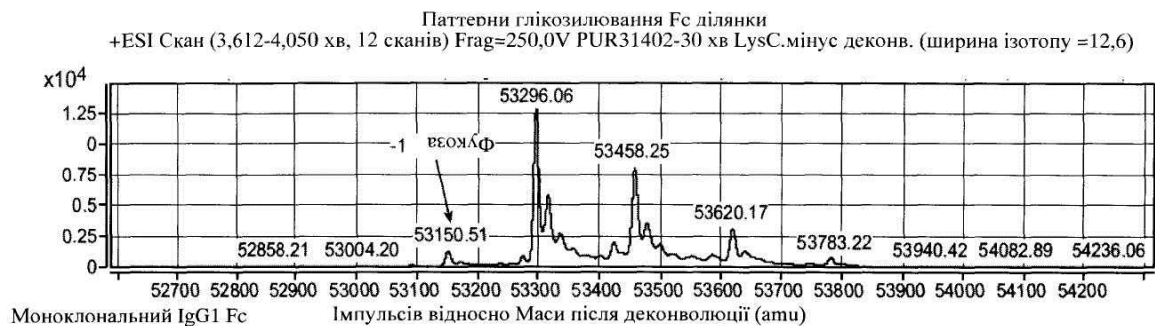
111. Застосування за будь-яким із пп. 57-84 або 86-109, у якому фармацевтичну композицію або химерний білок IL-22 Fc треба вводити підшкірно.

15 112. Застосування за будь-яким із пп. 57-111, у якому суб'єктом є хворий.

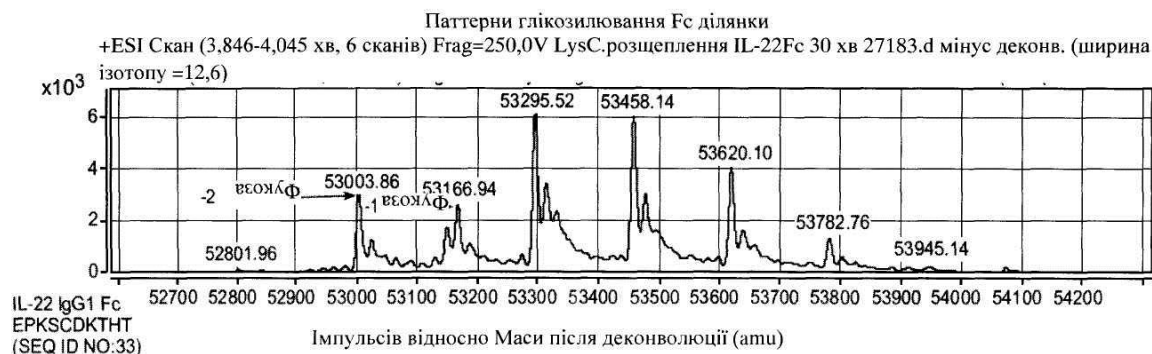
113. Застосування за будь-яким із пп. 57-112, у якому суб'єктом є людина.

Людина (Q9GZX6)	apisshcrlldksnfqppyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvsmsercylnk	60
Шимпанзе (XP_003313906)	apisshcrlldkssfqppyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvsmsercylnk	
Орангутан (XP_002823544)	apisshcrlldksnfqppyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvsmsercylnk	
Миша (Q9JJY9)	lpvntcklevsnfqppyivnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvmsakdqcylnk	
Собака (XP_538274)	lpisshcrlldksnfqppyitnrtfmlakeasladnntdvrligeklfhgvnmgercylnl	
	* * * * *	
Людина (Q9GZX6)	qvlntfleevlfpqsdrrfpymqevvpflarlsnrlstchiegddlhiqrnvqklkdtvk	120
Шимпанзе (XP_003313906)	qvlntfleevlfpqsdrrfpymqevvpflarlsnrlstchiegddlhiqrnvqklkdtvk	
Орангутан (XP_002823544)	qvlntfleevlfpqsdrrfpymqevvpflarlsnrlstchiegddlhiqrnvqklkdtvk	
Миша (Q9JJY9)	qvlntfledvllpqsdrrfpymqevvpfltklsnqlsschisgddqniqknvrrlketvk	
Собака (XP_538274)	evlntfleevlfpqsdrrfpymqevvpflarlsnklsgchiendgghiqrnvqklkdtvk	
	***** ** ***** **	
Людина (Q9GZX6)	klgesgeikaigeldllfmslrnaci	146 (SEQ ID NO:4)
Шимпанзе (XP_003313906)	klgengeikaigeldllfmslrnaci	(SEQ ID NO:48)
Орангутан (XP_002823544)	klgesgeikaigeldllfmslrnaci	(SEQ ID NO:49)
Миша (Q9JJY9)	klgesgeikaigeldllfmslrnacv	(SEQ ID NO:50)
Собака (XP_538274)	klgengeikaigeldllfmalrnacv	(SEQ ID NO:51)
	**** *****	

Fig. 1



Фіг. 2А



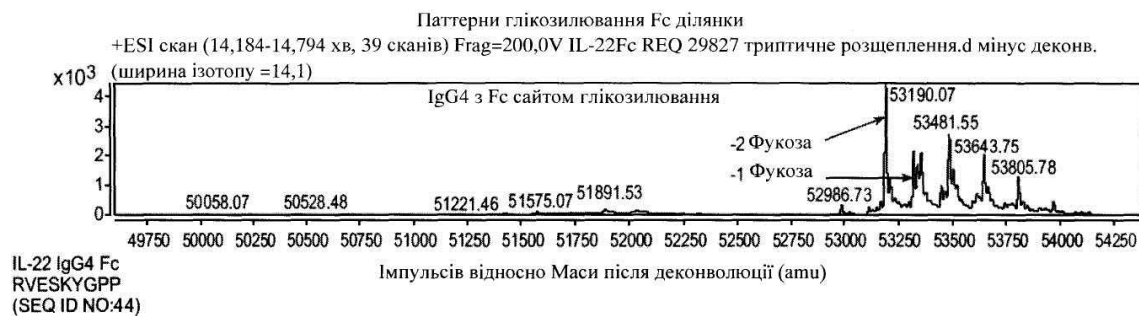
Фіг. 2В



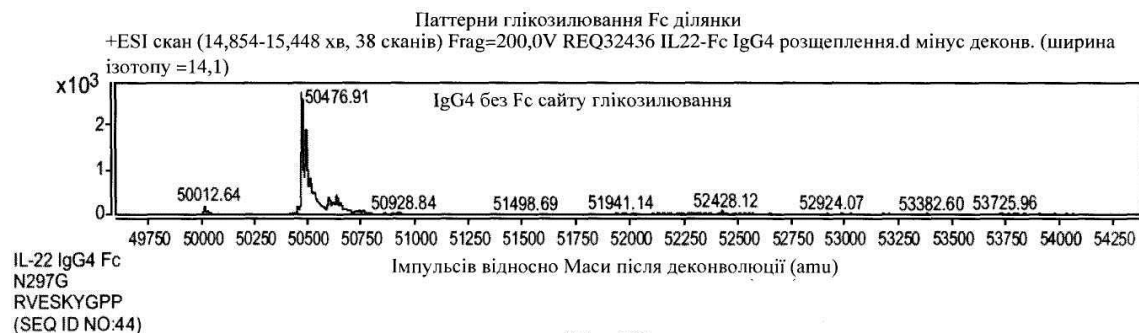
Фіг. 2С



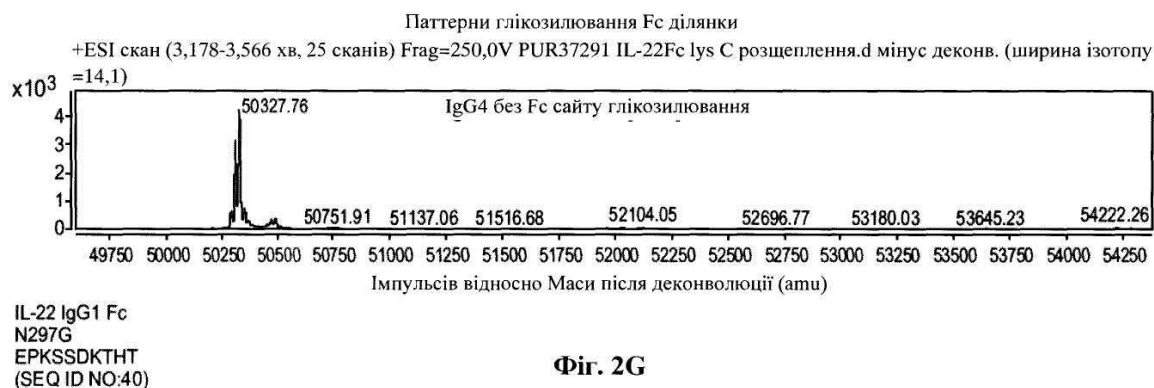
Фіг. 2D



Фіг. 2E



Фіг. 2F

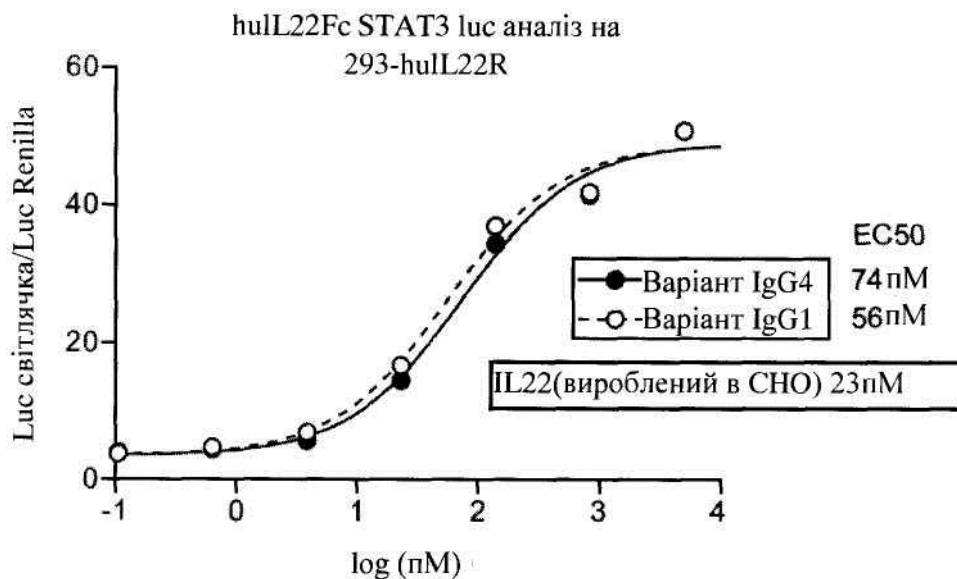


Фіг. 2G

**Фіг. 3**

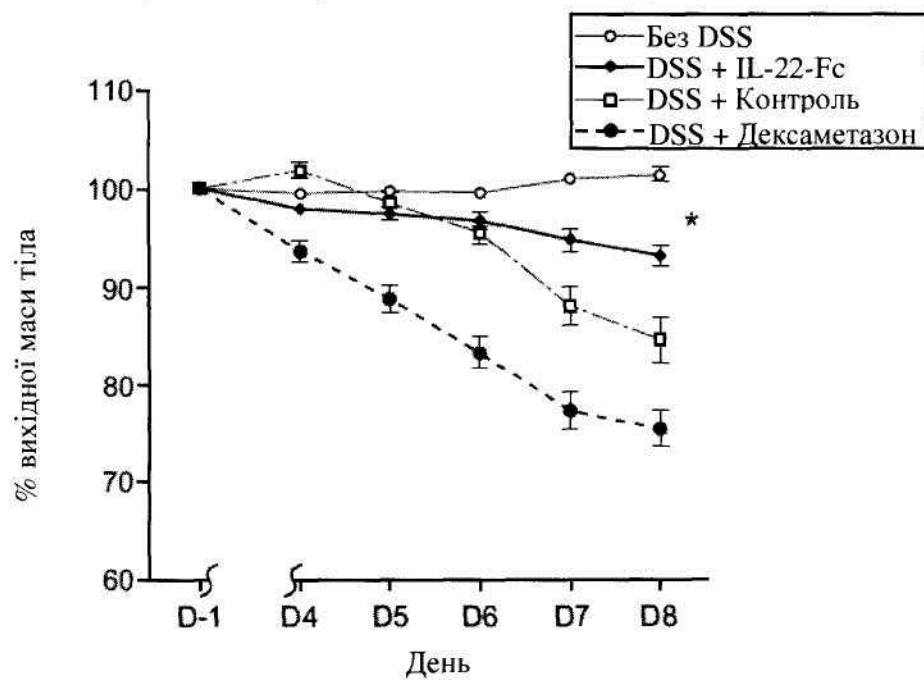
[Зрілий N-кінцевий IL-22]			
IL-22 IgG4 Fc	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGV		50
IL-22 IgG1 Fc	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGV		50
IL-22	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGV		50
IL-22 IgG4 Fc	SMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCH		100
IL-22 IgG1 Fc	SMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCH		100
IL-22	SMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCH		100
C-кінець][Лінкер			
IL-22 IgG4 Fc	IEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIRVES		150
IL-22 IgG1 Fc	IEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIRVES		150
IL-22	IEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI (SEQ ID NO:4)		146
][Fc			
IL-22 IgG4 Fc	K-YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQE		199
IL-22 IgG1 Fc	SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE		200
N297G			
IL-22 IgG4 Fc	DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY		249
IL-22 IgG1 Fc	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY		250
IL-22 IgG4 Fc	KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV		299
IL-22 IgG1 Fc	KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV		300
IL-22 IgG4 Fc	KGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE		349
IL-22 IgG1 Fc	KGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ		350
IL-22 IgG4 Fc	GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (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 і IgG4 мають схожу активність in Vitro

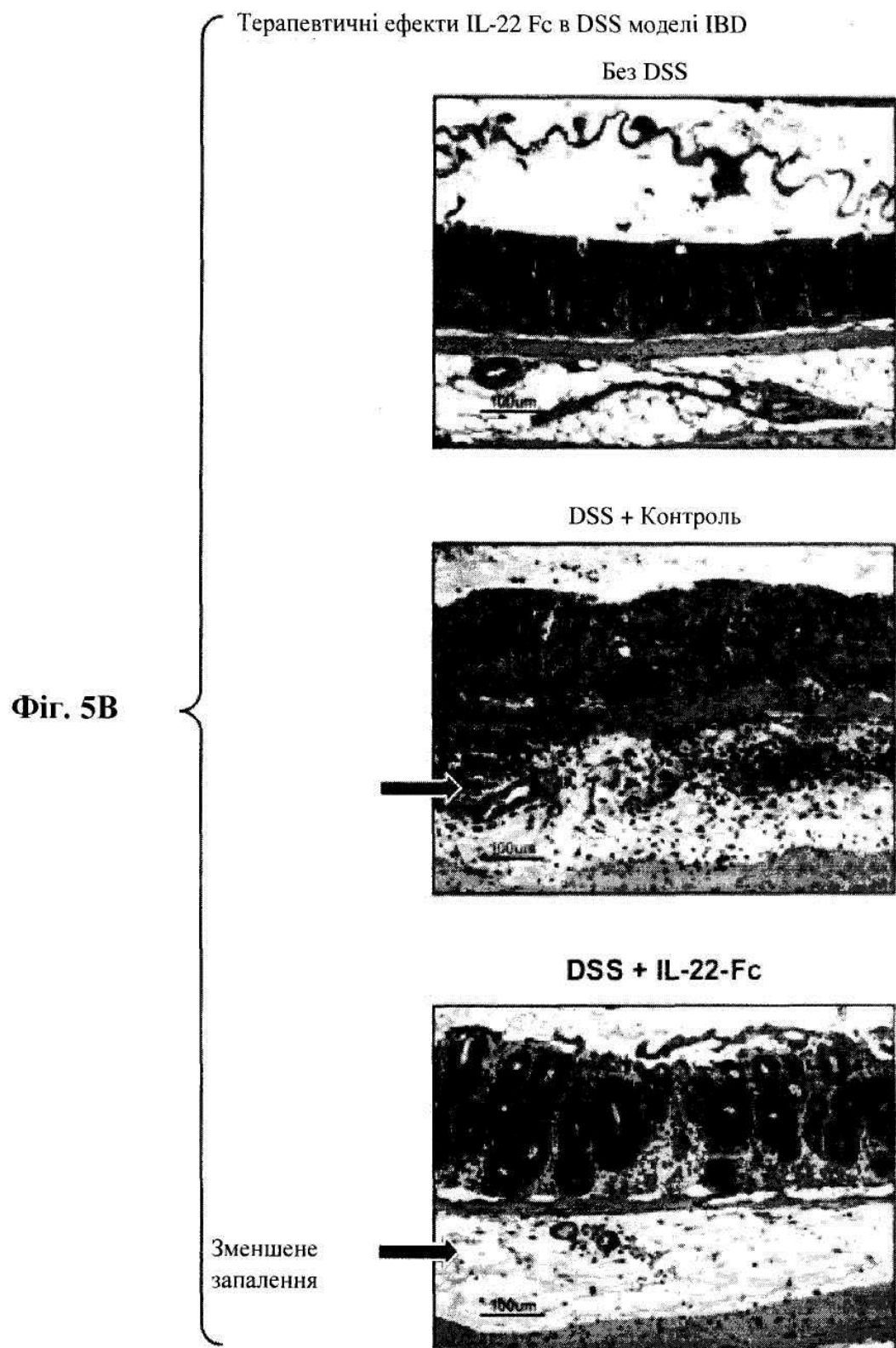


**Фіг. 4**

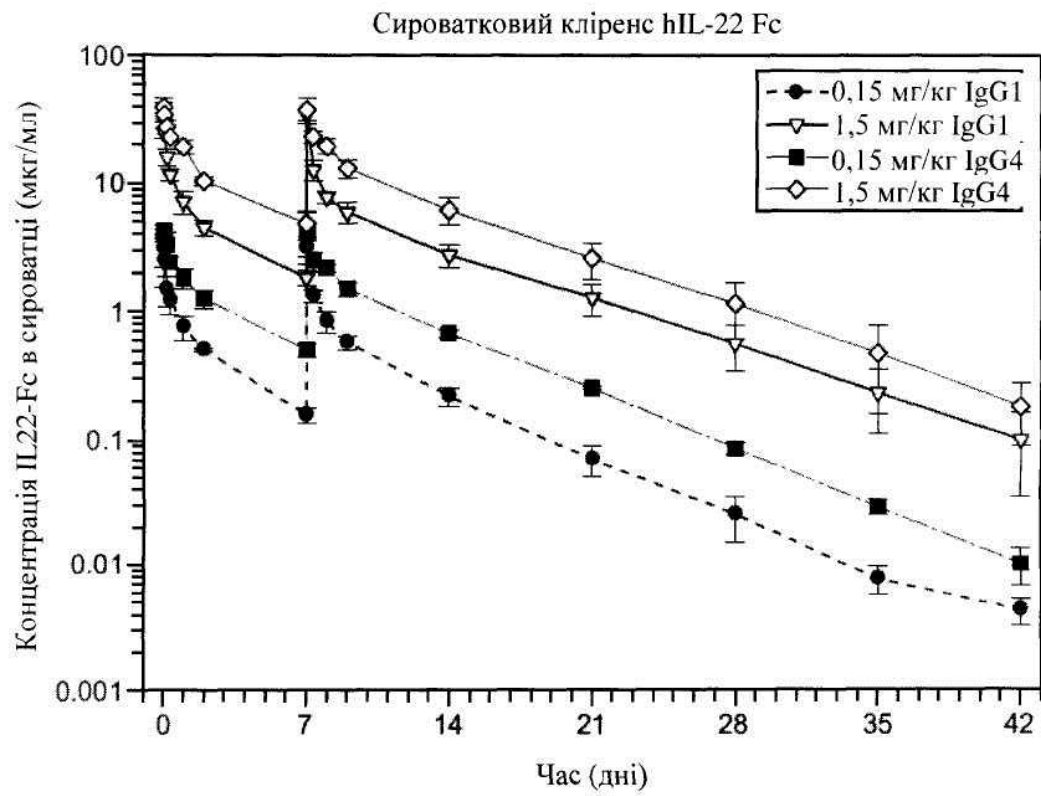
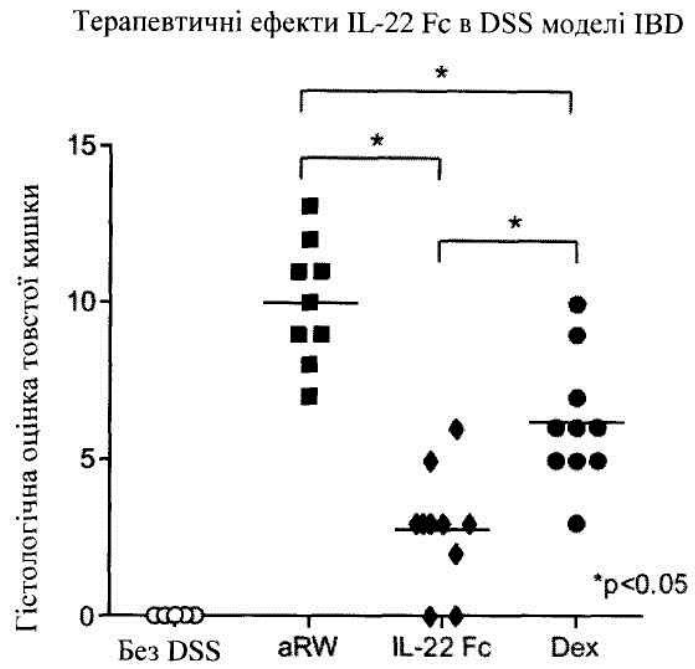
Терапевтичні ефекти IL-22 Fc в DSS моделі IBD



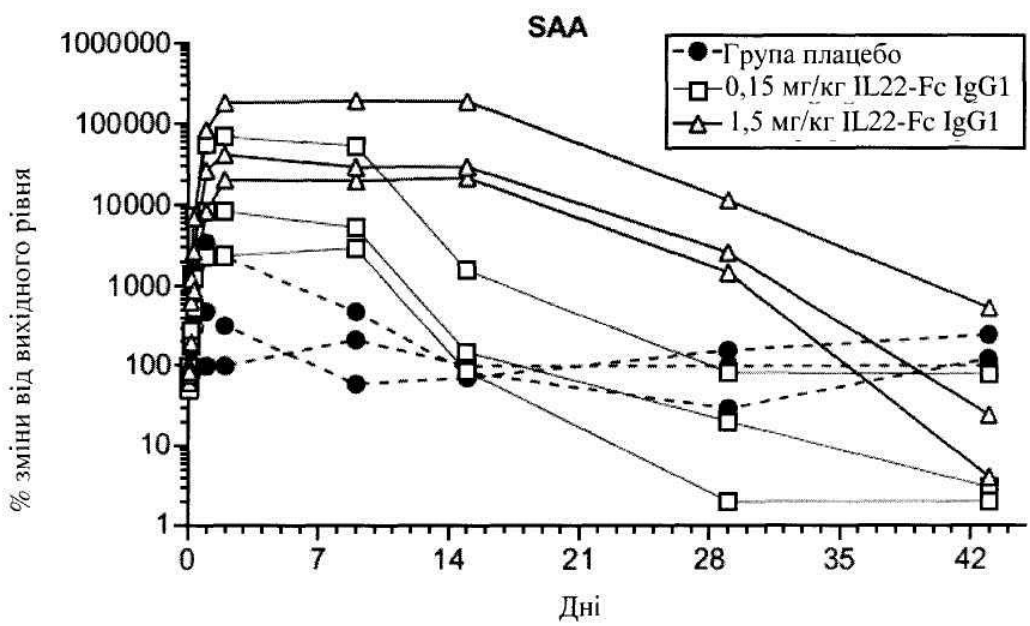
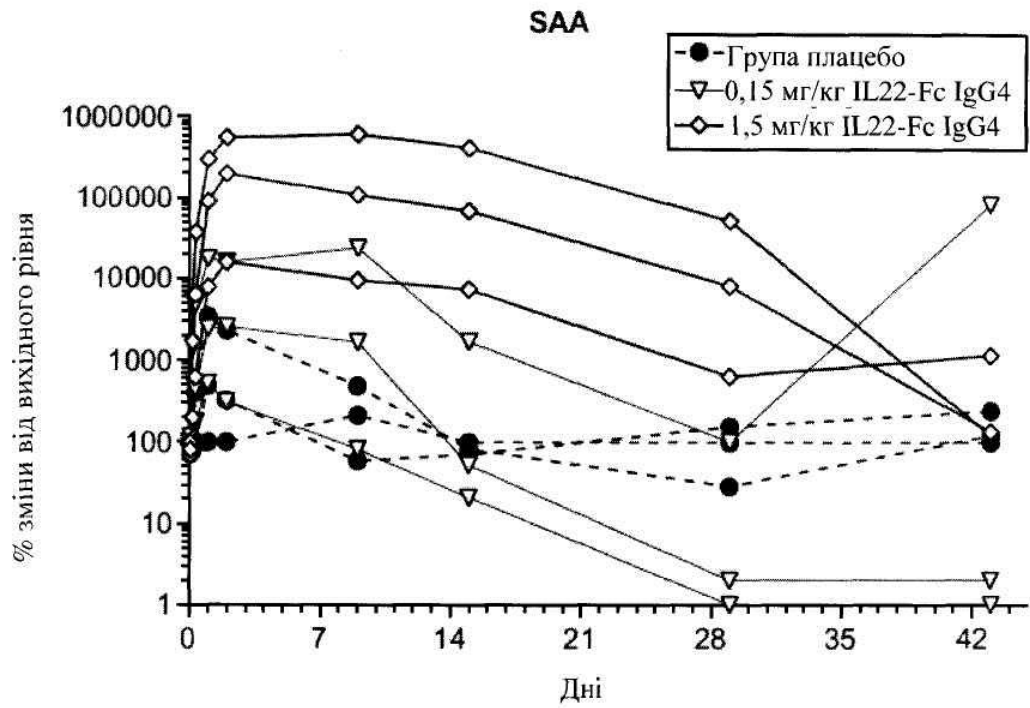
Фіг. 5А



Фіг. 5С

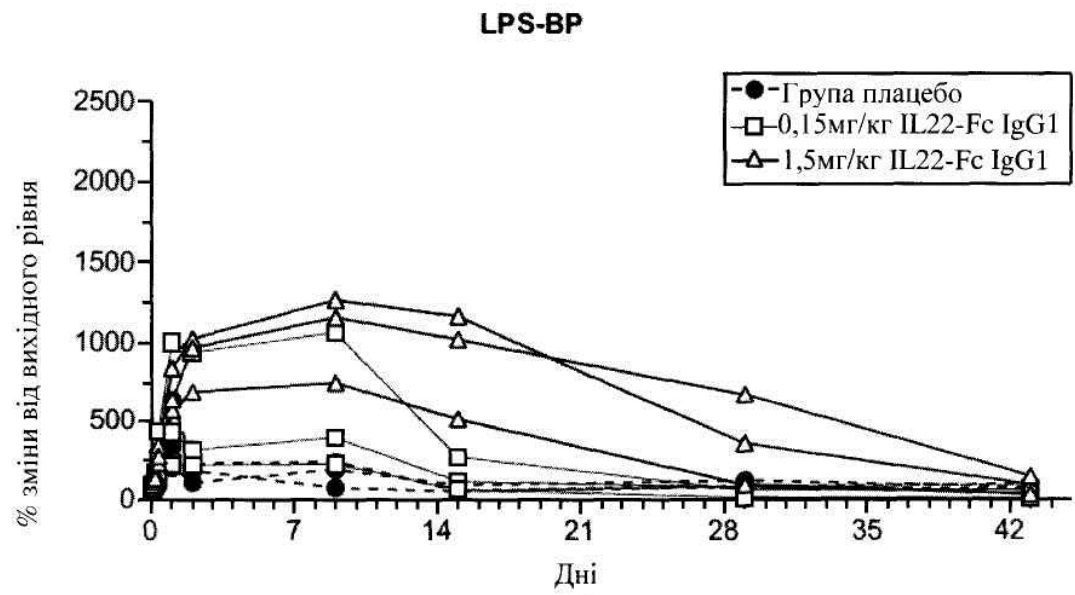
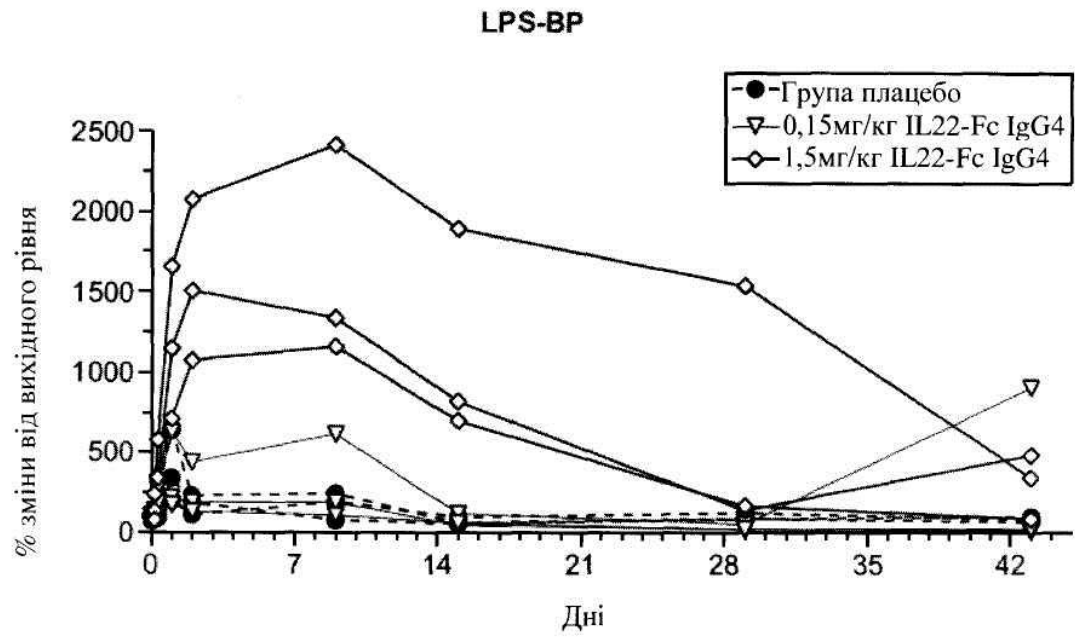


Фіг. 6

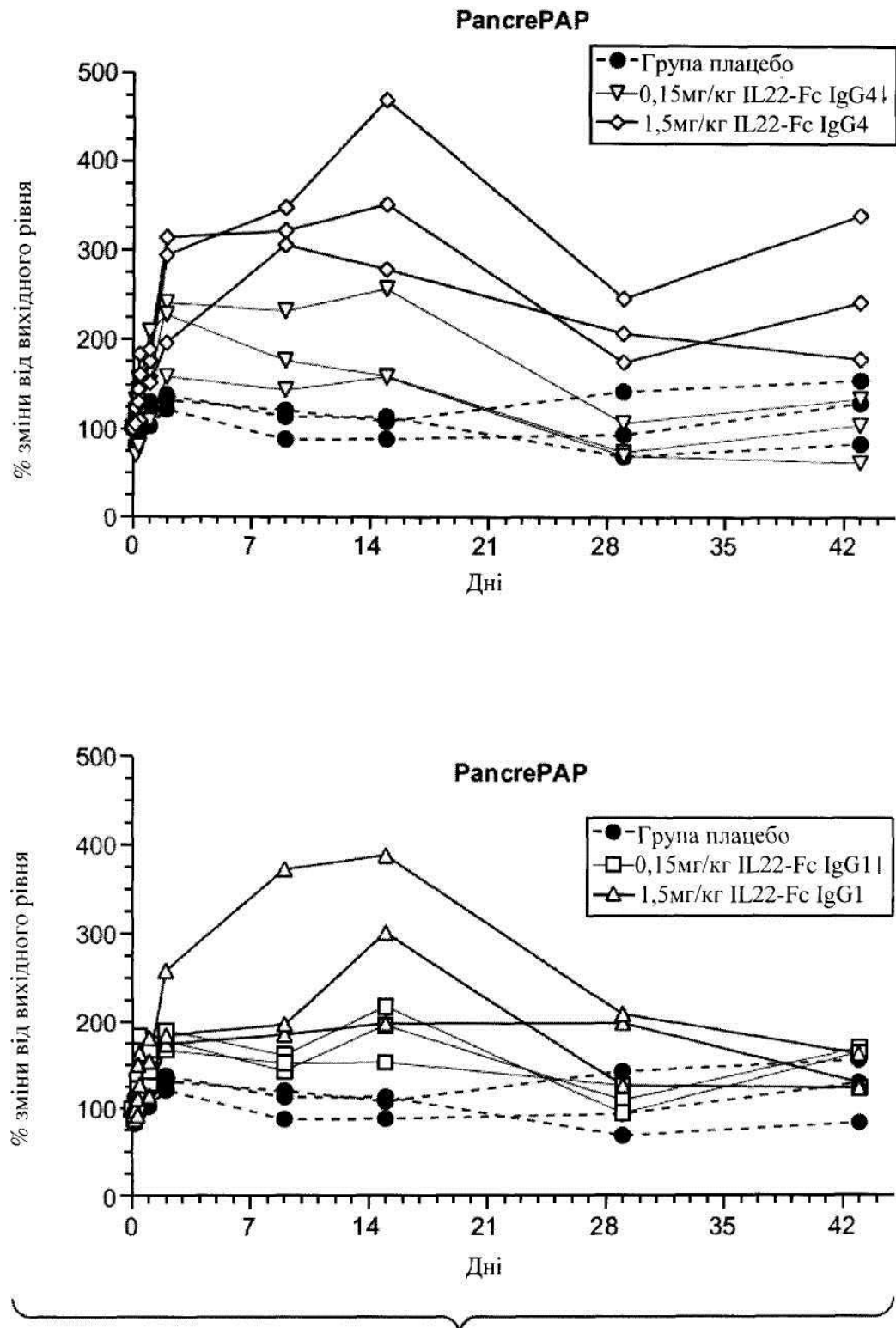


Фіг. 7А

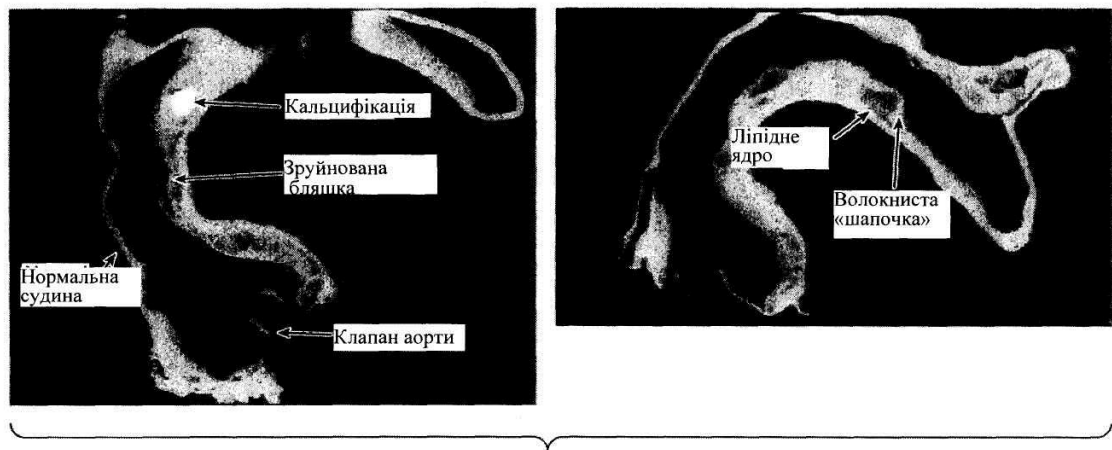




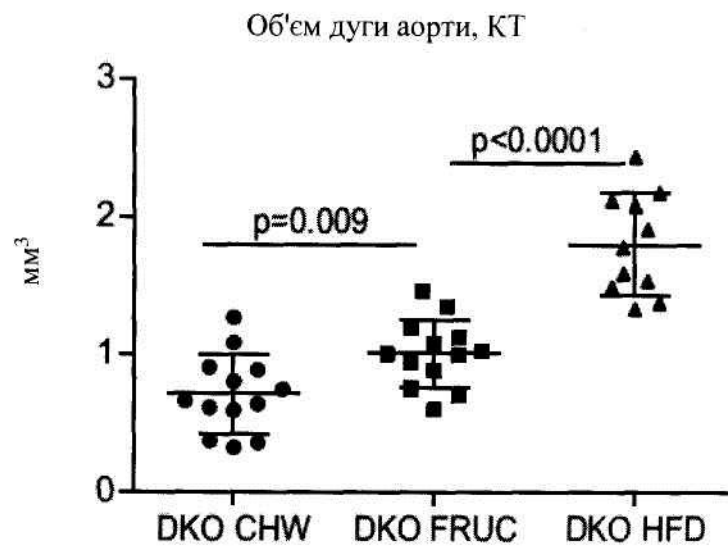
Фіг. 7В



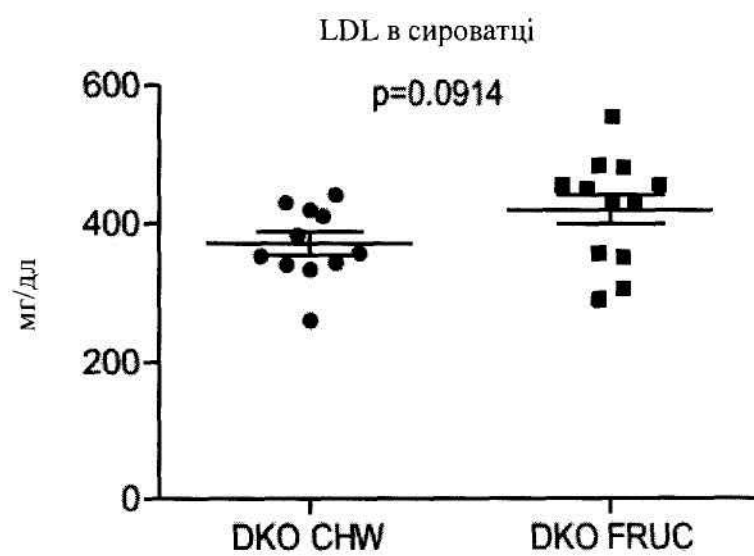
Фіг. 7С



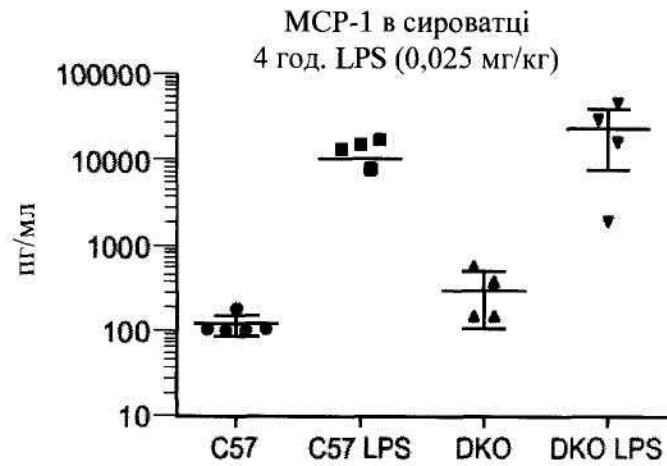
Фіг. 8



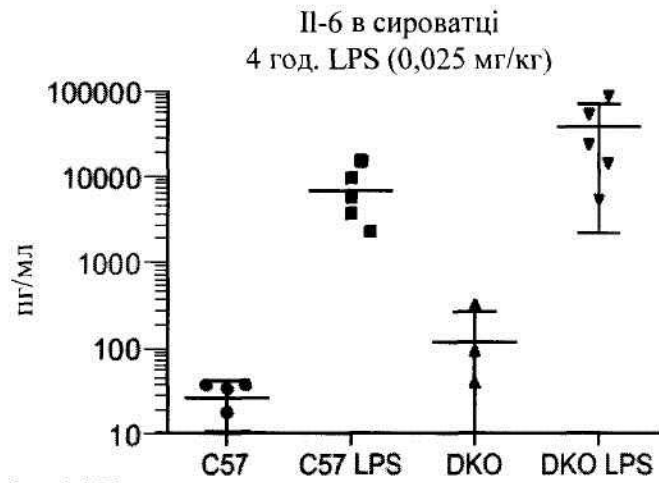
Фіг. 9А



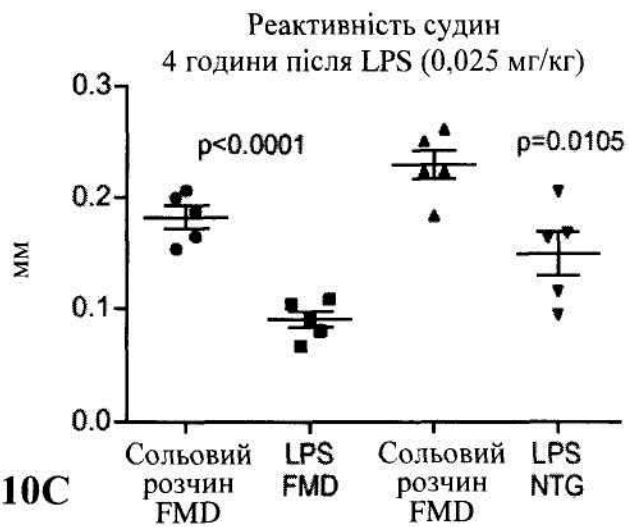
Фіг. 9В



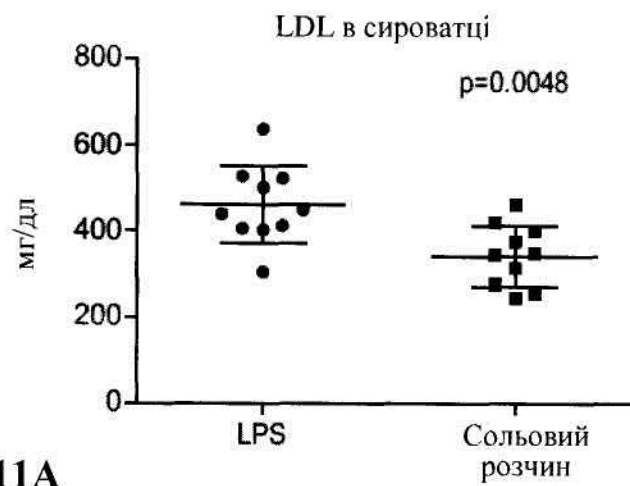
Фіг. 10А



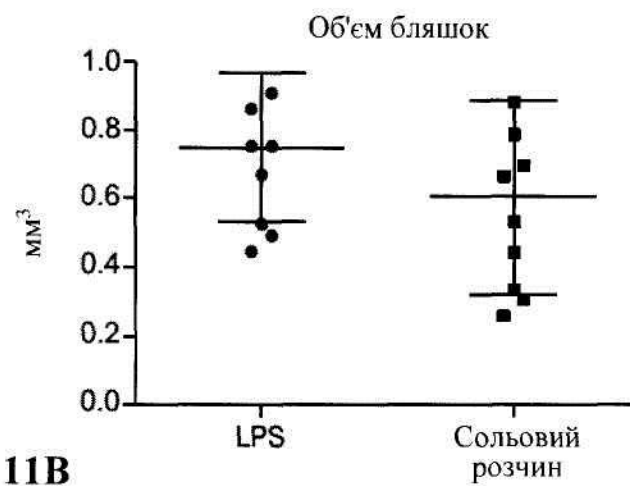
Фіг. 10В



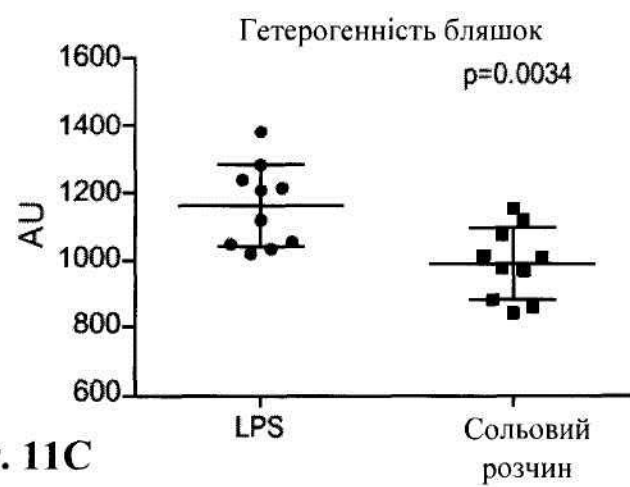
Фіг. 10С



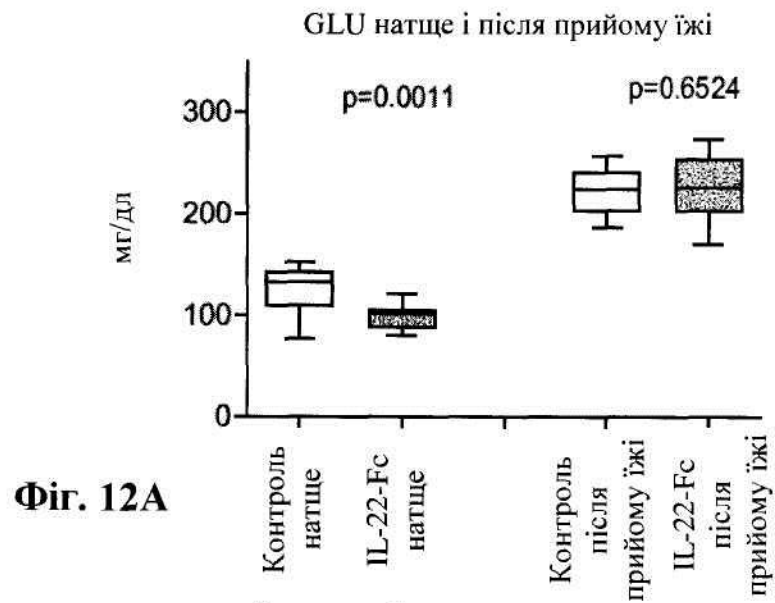
Фіг. 11А



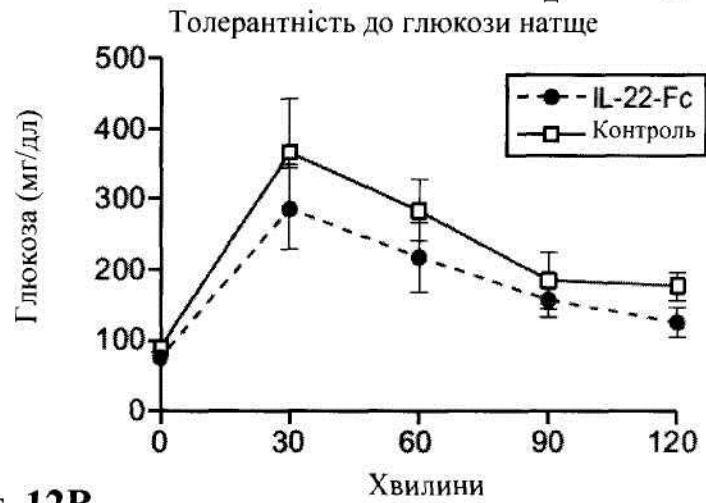
Фіг. 11В



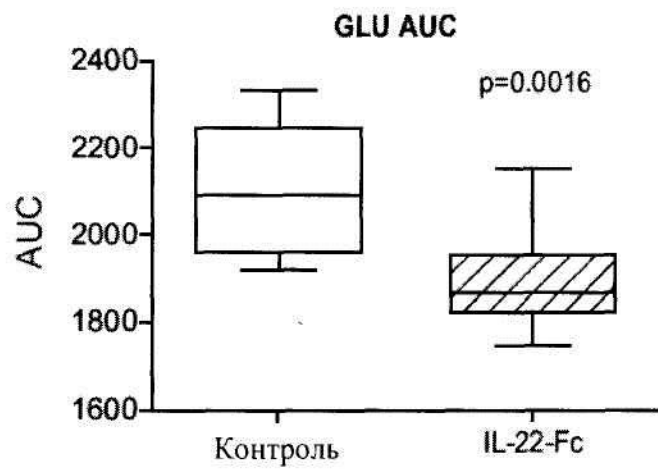
Фіг. 11С



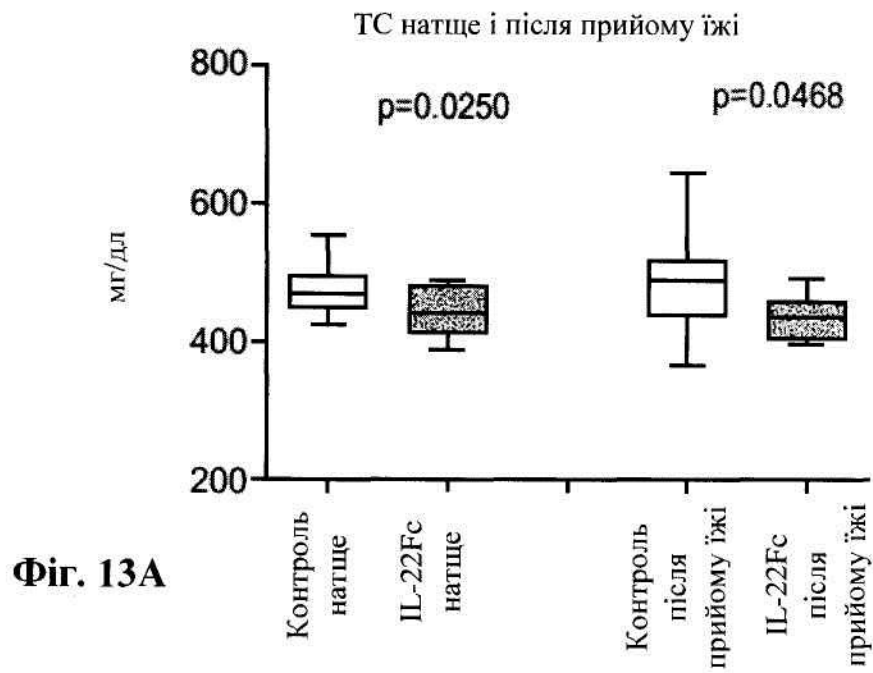
Фіг. 12А



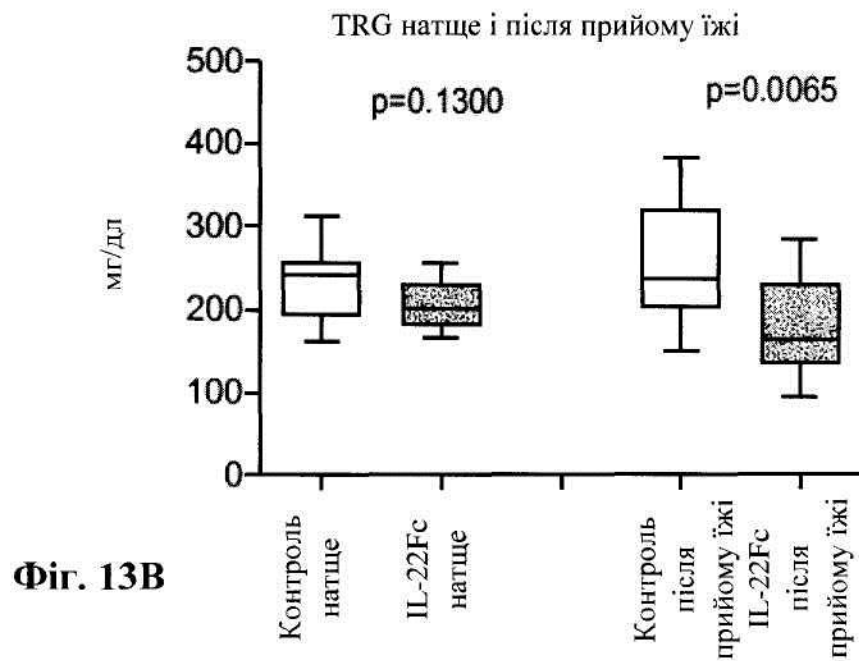
Фіг. 12В



Фіг. 12С

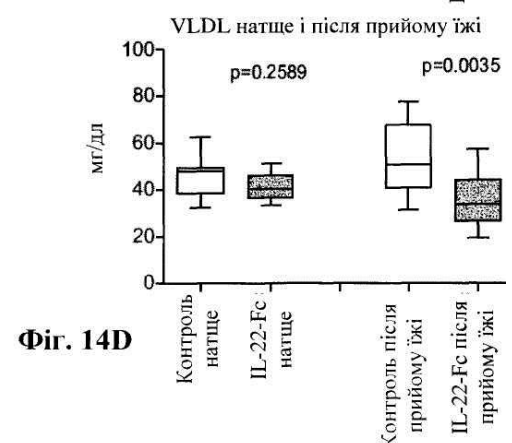
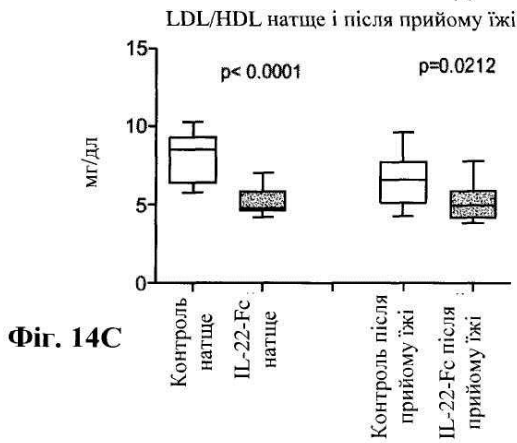
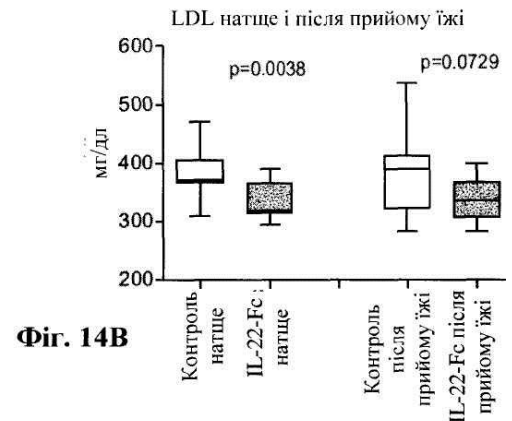
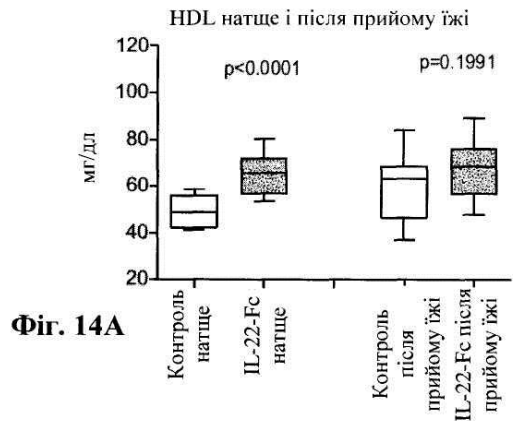


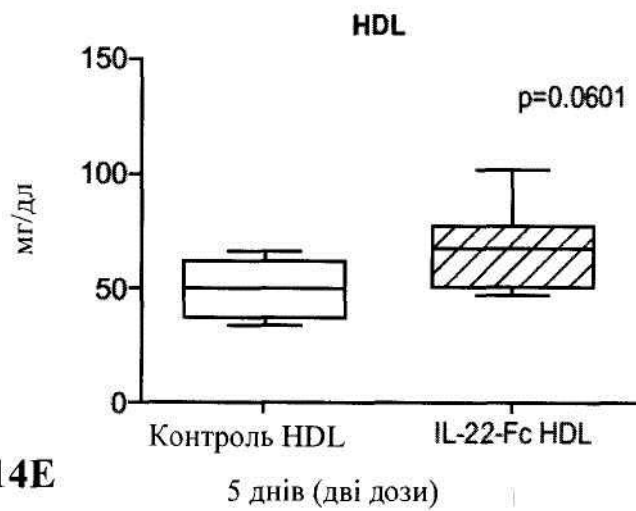
Фіг. 13А



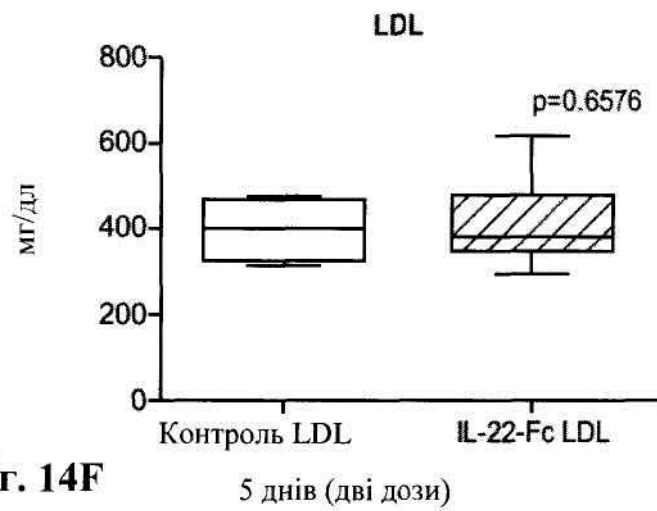
Фіг. 13В



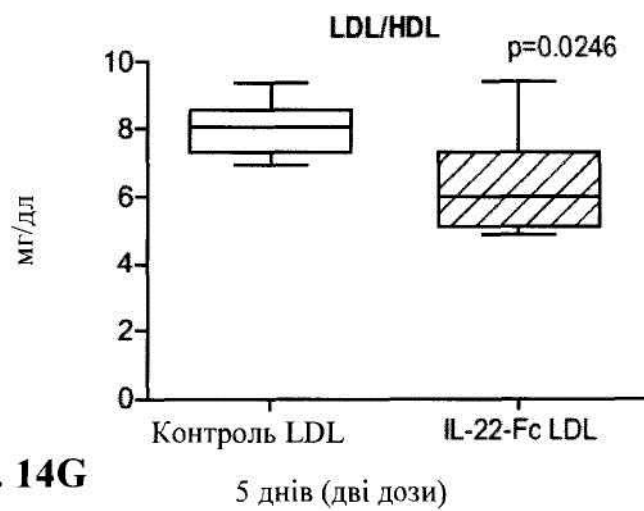




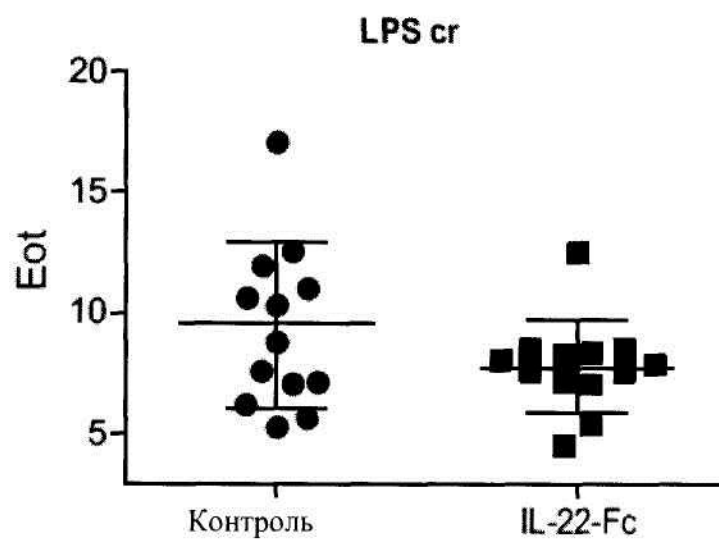
**Фіг. 14E**



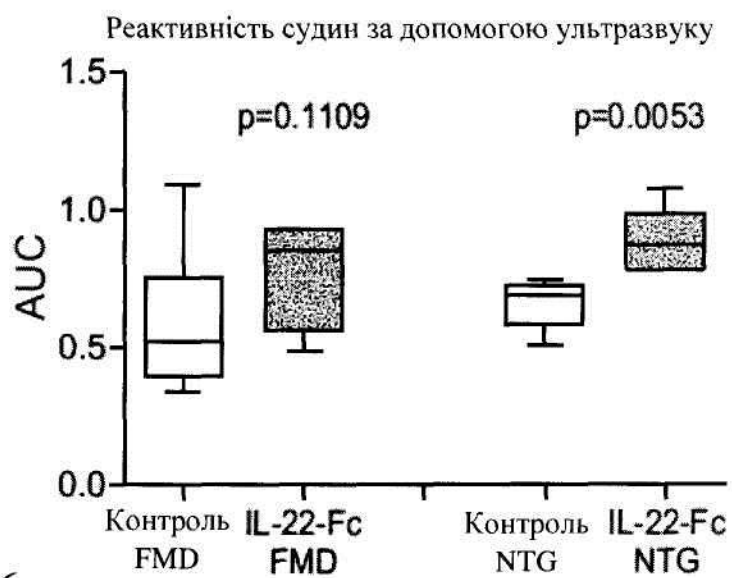
**Фіг. 14F**



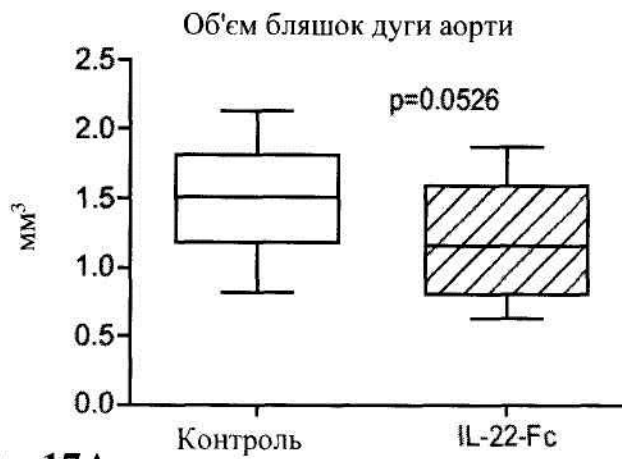
**Фіг. 14G**



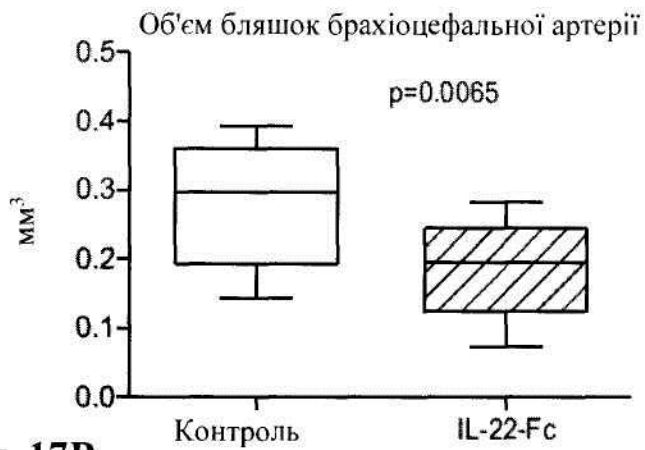
**Fig. 15**



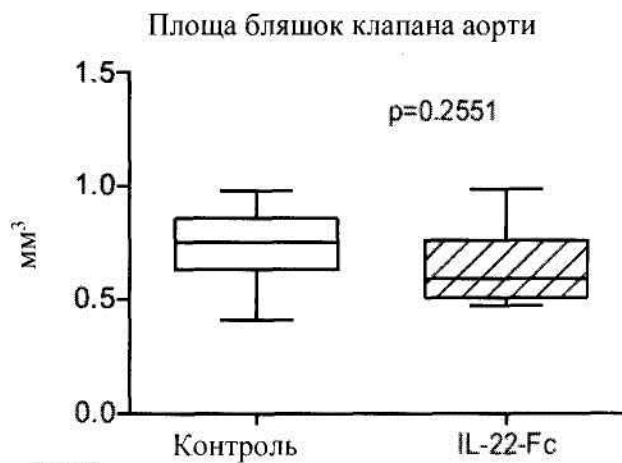
**Fig. 16**



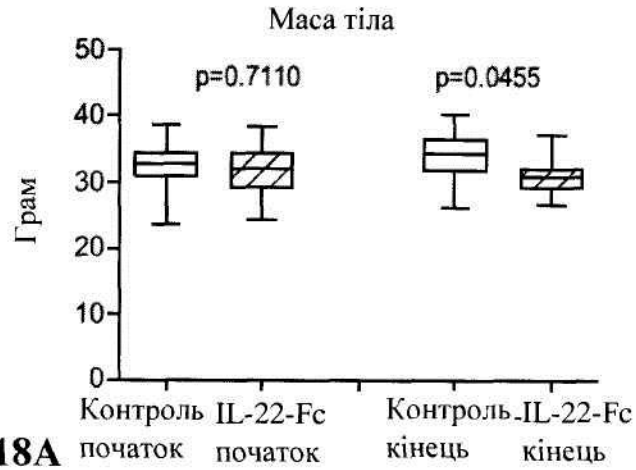
Фіг. 17А



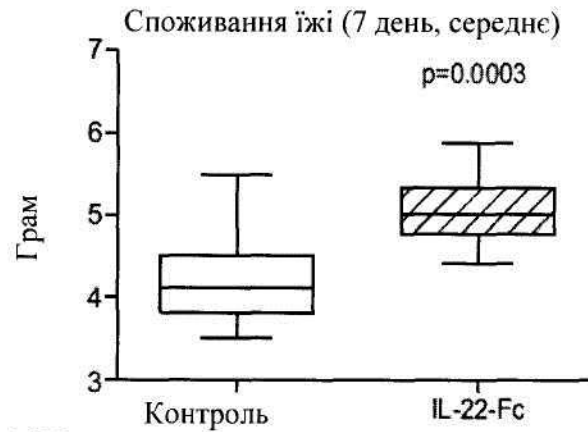
Фіг. 17В



Фіг. 17С



Фіг. 18А

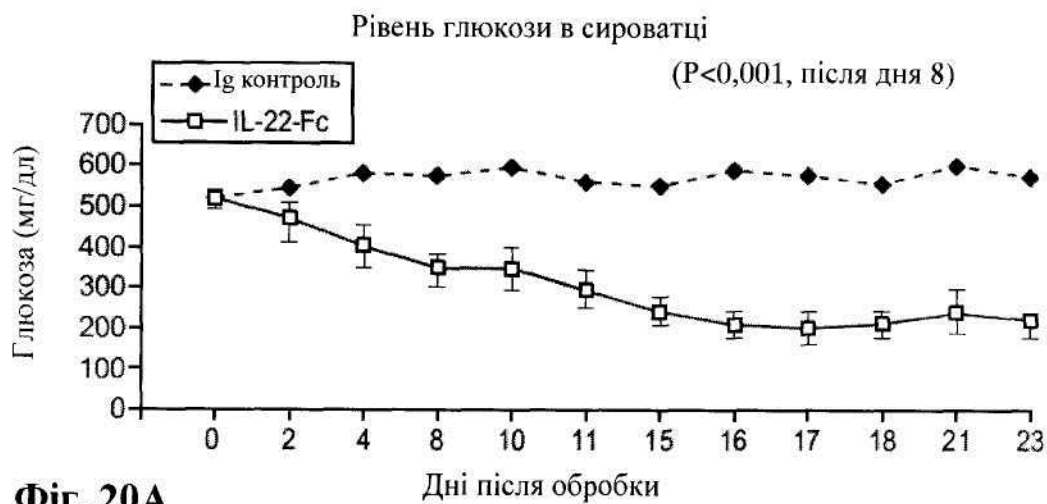


Фіг. 18В

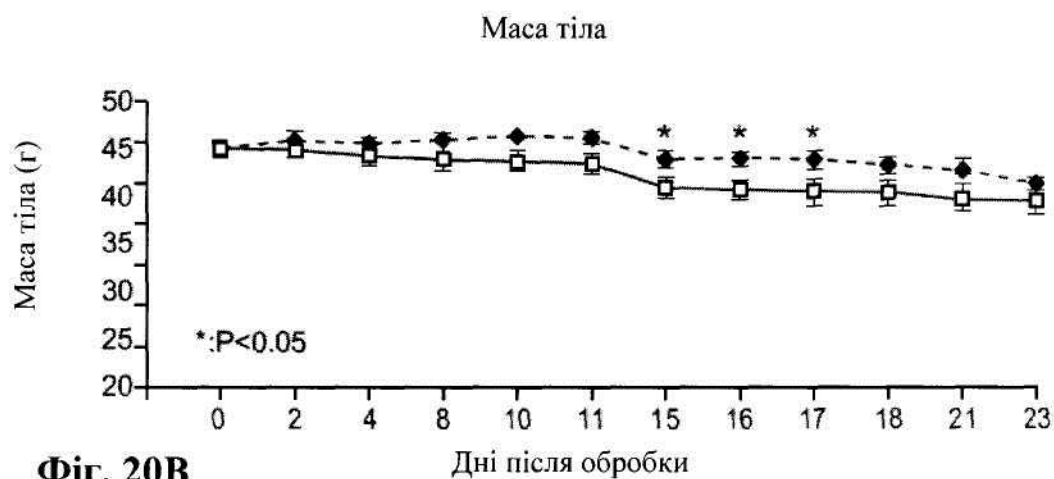
Модель Db/Db



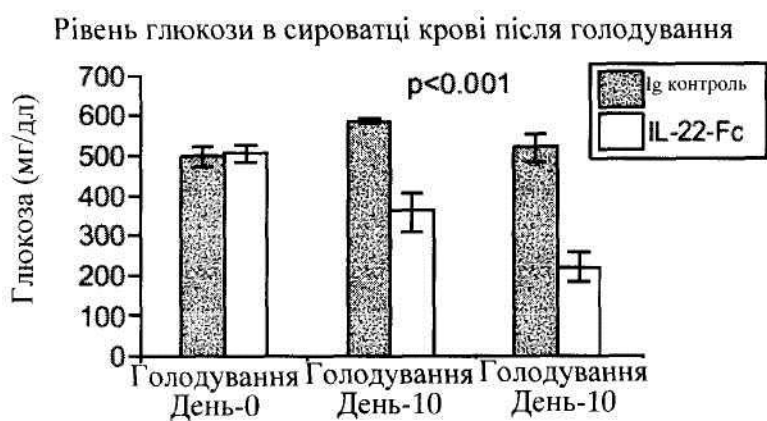
Фіг. 19



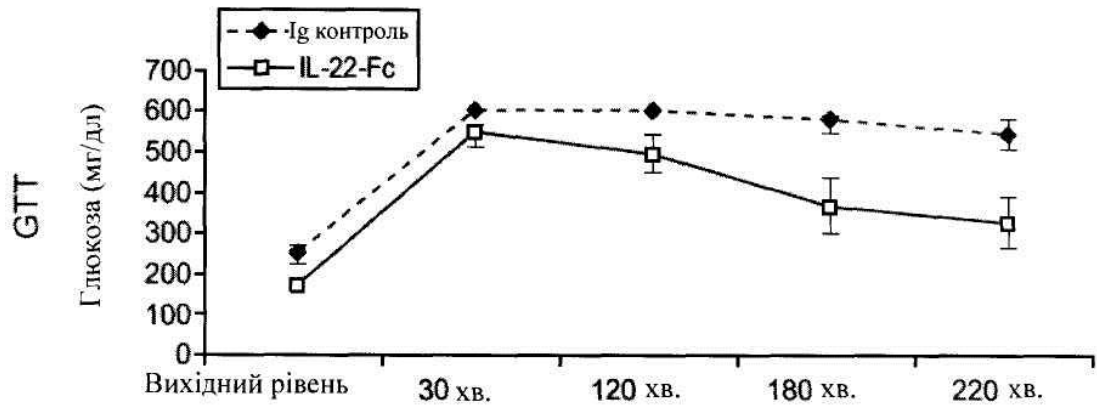
Фіг. 20А



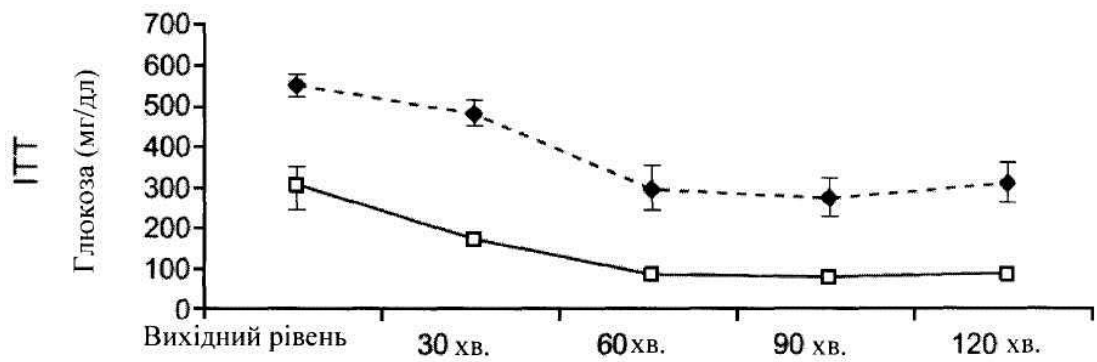
Фіг. 20В



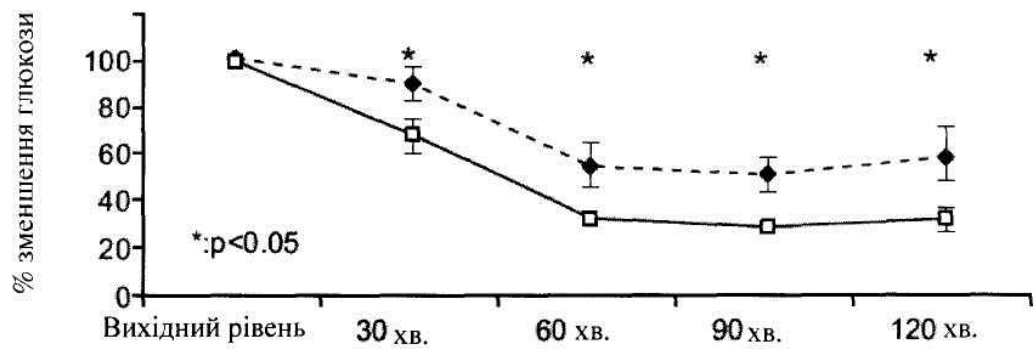
Фіг. 20С



Фіг. 21

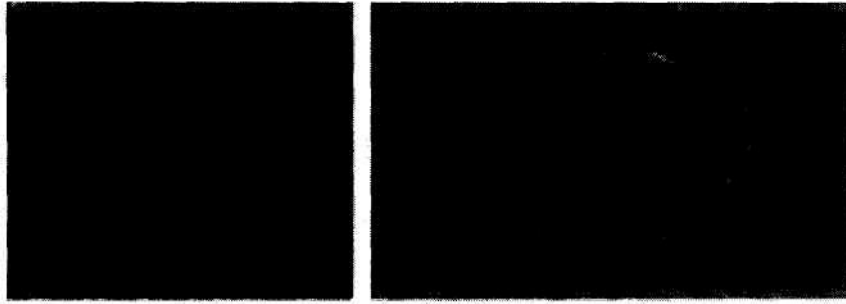


Фіг. 22А

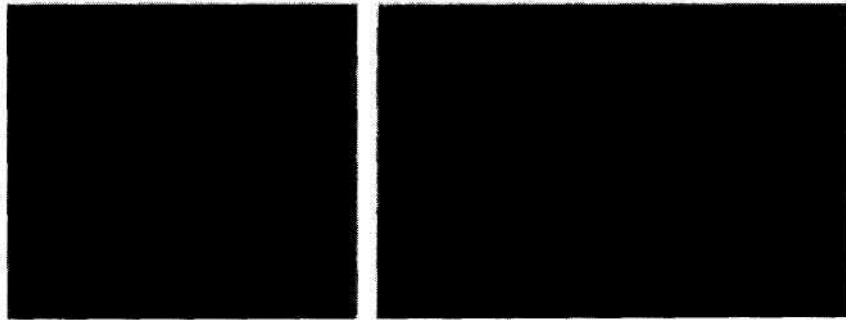


Фіг. 22В

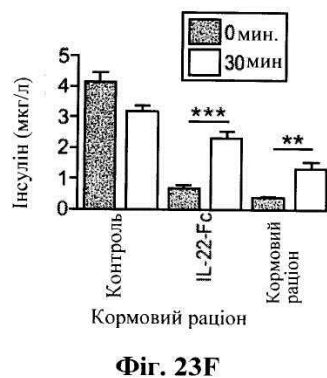
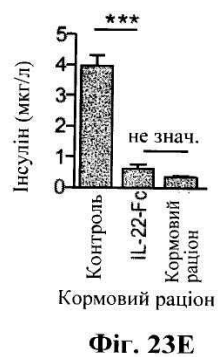
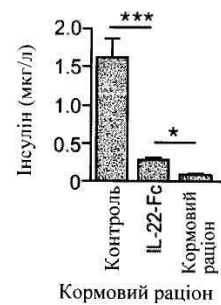
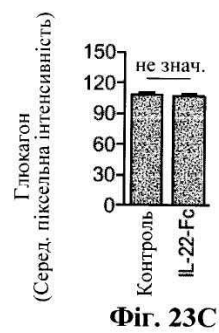
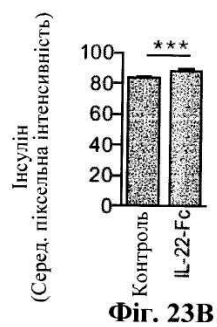
Герцептин



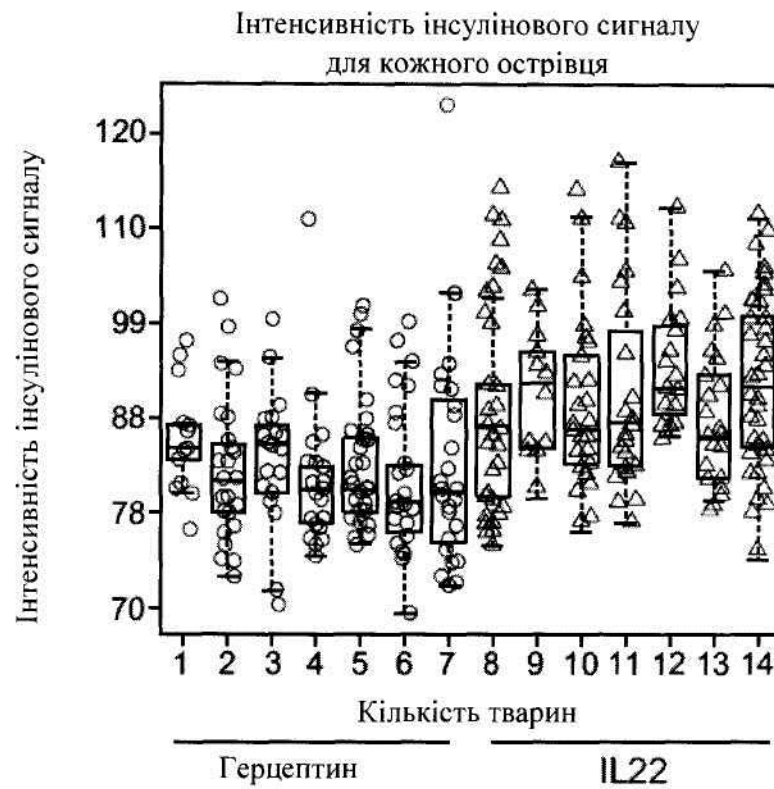
IL22-Fc



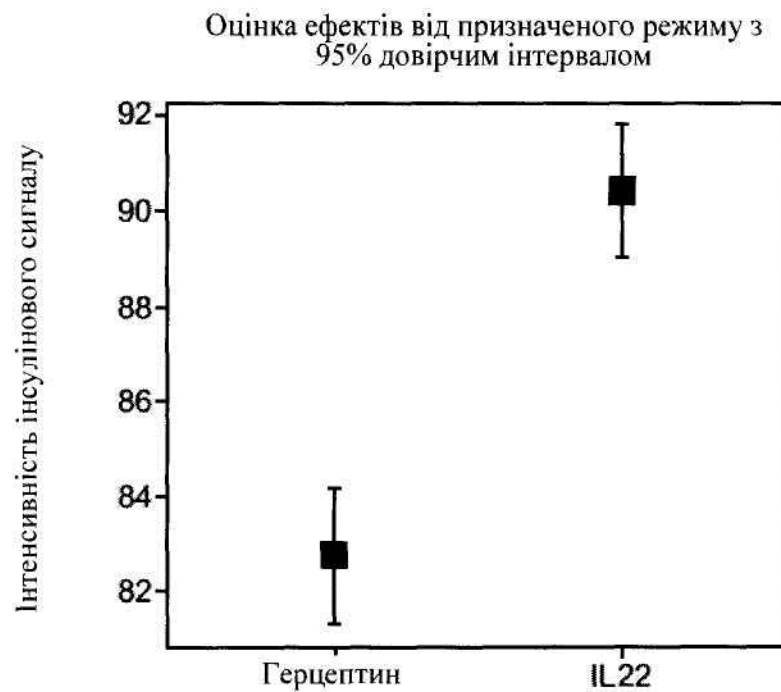
Фіг. 23А



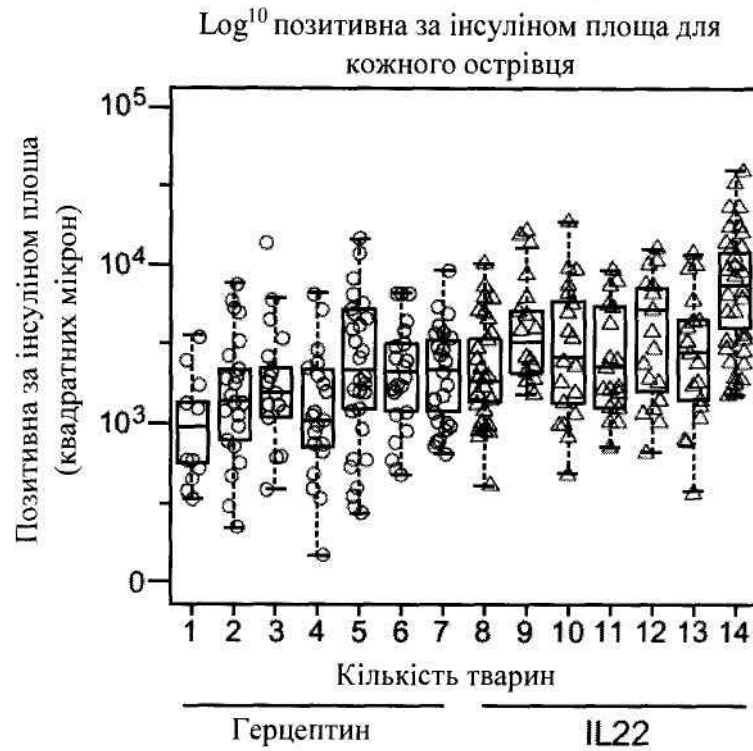




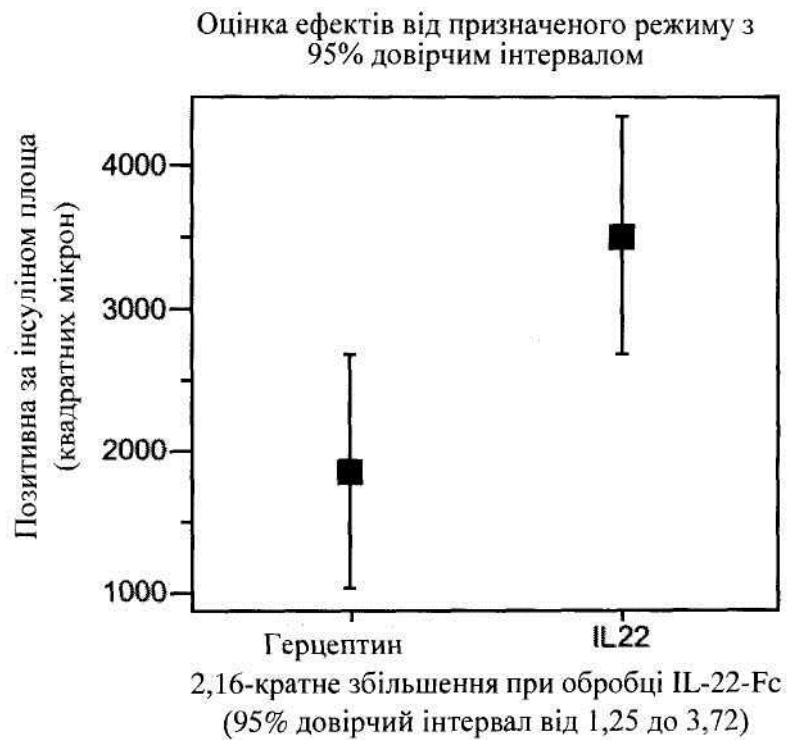
Фіг. 24А



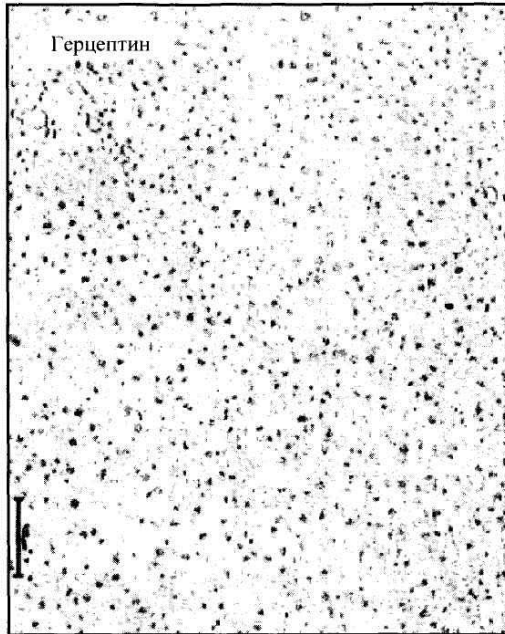
Фіг. 24В



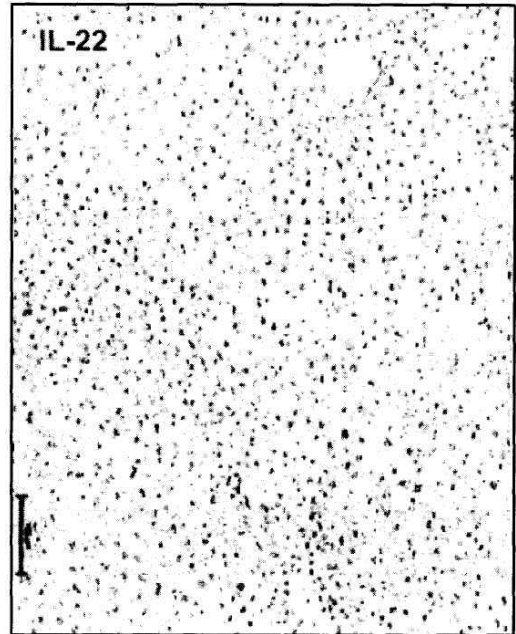
Фіг. 25А



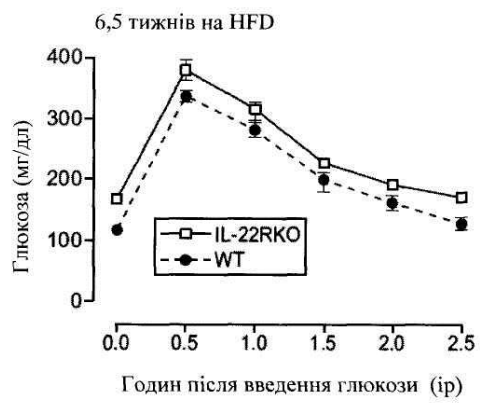
Фіг. 25В



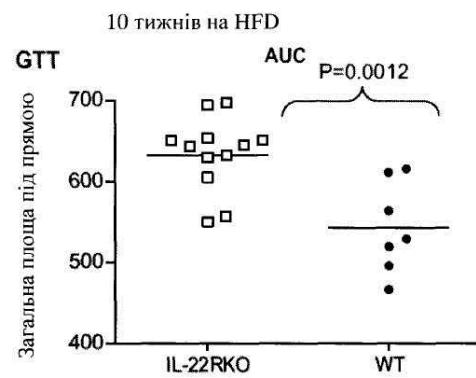
Фіг. 26А



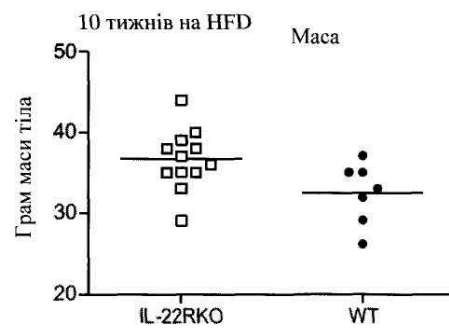
Фіг. 26В



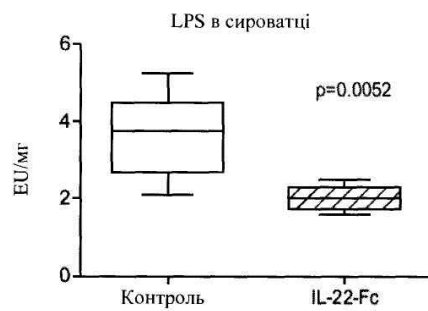
Фіг. 27А



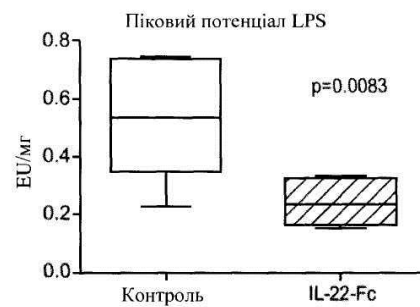
Фіг. 27В



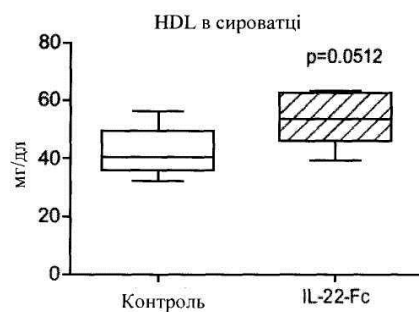
Фіг. 28



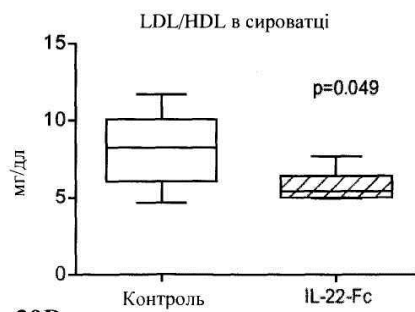
Фіг. 29А



Фіг. 29В



Фіг. 29С



Фіг. 29D

CTTCAGAACAGGTTCTCCTTCCCCAGTCACCAGTTGCTCGAGTTAGAATTGTCTGCAATGGCCGCCC  
 TGCAGAAATCTGTGAGCTCTTTCCTTATGGGGACCCTGGCCACCAGCTGCCTCCTTCTCTTGGCCCT  
 CTTGGTACAGGGAGGAGCAGCTGCGCCCATCAGCTCCCACTGCAGGCTTGACAAGTCCAACCTCCAG  
 CAGCCCTATATCACCAACCGCACCTTCATGCTGGCTAAGGAGGCTAGCTTGGCTGATAACAACACAG  
 ACGTTCGTCTCATTGGGGAGAACTGTTCCACGGAGTCAGTATGAGTGAGCGCTGCTATCTGATGA  
 AGCAGGTGCTGAACCTCACCCCTGAAGAAGTGCTGTTCCCTCAATCTGATAGGTTCCAGCCTTATAT  
 GCAGGAGGTGGTGCCCTTCTGGCCAGGCTCAGCAACAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGA  
 TGACCTGCATATCCAGAGGAATGTGCAAAAGCTGAAGGACACAGTGAAAAAGCTTGGAGAGAGTGG  
 AGAGATCAAAGCAATTGGAGAACTGGATTTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCCTGCATTGACC  
 AGAGCAAAGCTGAAAAATGAATAACTAACCCCTTTCCTGCTAGAAATAACAATTAGATGCCCA  
 AAGCGATTTTTTTTAAACAAAAGGAAGATGGGAAGCCAACTCCATCATGATGGGTGGATTCCAAA  
 TGAACCCCTGCGTTAGTTACAAAGGAAACCAATGCCACTTTTGTATAAGACCAGAAGGTAGACT  
 TTCTAAGCATAGATATTTATTGATAACATTTTCATTGTAACCTGGTGTCTATACACAGAAAAACAATT  
 TATTTTTTAAATAATTGTCTTTTCCATAAAAAAGATTACTTTCCATTCCCTTAGGGGAAAAAAC  
 CCTAAATAGCTTCATGTTTCCATAATCAGTACTTTATATTTATAAATGTATTTATTATTATTATAA  
 GACTGCATTTTATTATATCATTTTATTAATATGGATTATTTATAGAAACATCATTCGATATTGC  
 TACTTGAGTGTAAAGCTAATATTGATATTTATGACAATAATTATAGAGCTATAACATGTTTATTG  
 ACCTCAATAAACACTTGGATATCCC

SEQ ID NO. 70

Fig. 30

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGGAAPISSHCRLDKSNFQQPVITNRTFMLAKEASLADN  
 NTDVRLIGELFHHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIE  
 GDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

SEQIDNO.71

Сигнальний пептид: амінокислоти 1-33

Fig. 31

mIL22mIgG2a

Білок

MAVLQKSMFSFLMGTLAASCLLLIALWAQEFANALPVNTRCKLEVSNFQQPYIVNRTFMLA  
 KEASLADNNTDVRLLIGEKLFRGVSAKDQCYLMKQVLNFTLEDVLLPQSDRFQPYMQEVVP  
 FLTKLSNQLSSCHISGDDQNIQKNVRLKETVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACVAR  
 GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN  
 NVEVHTAQTTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK  
 GSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMYTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD  
 SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSYVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ. ID. NO. 73

Фиг. 32A

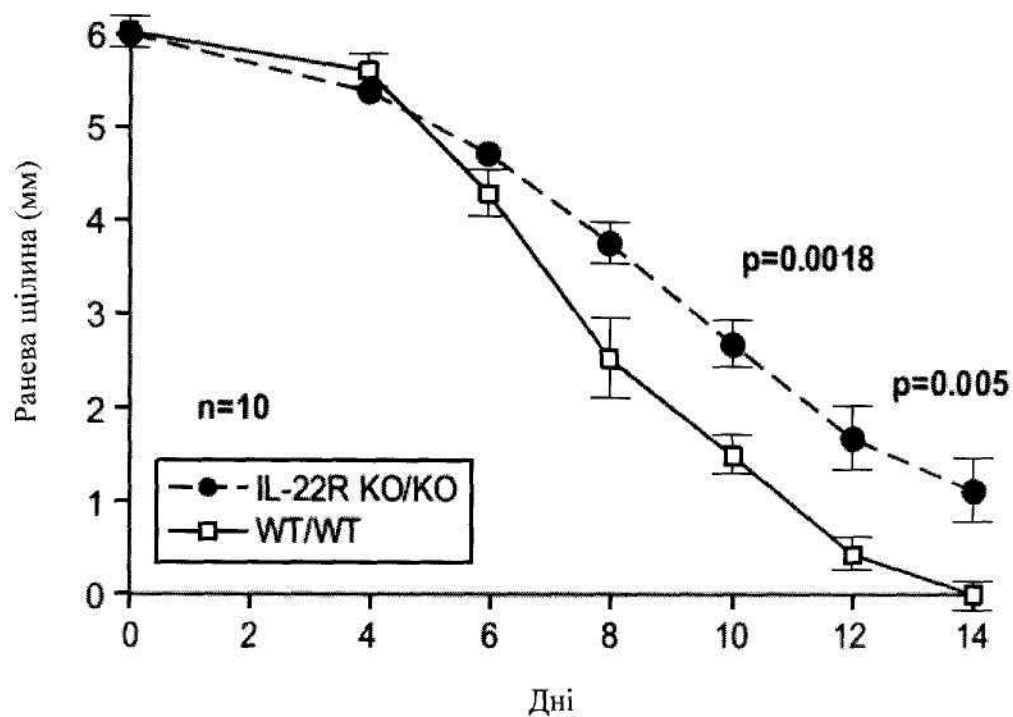
mIL22mIgG2a

Послідовність ДНК:

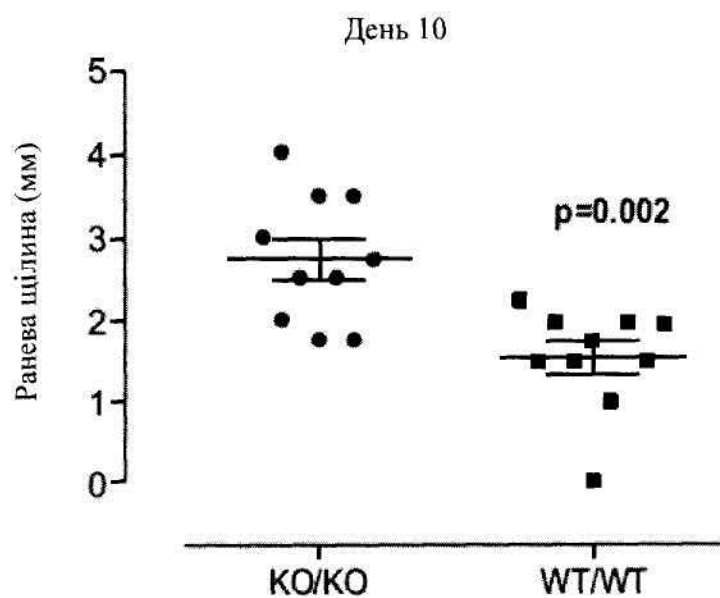
ATGGCTGTCTCGCAGAAATCTATGAGTTTTTCCCTTATGGGGACTTTGGCCGCCAGCTG  
 CCTGCTTCTCATTTGCCCTGTGGGCCAGGAGGCAAATGCGC  
 TGCCCGTCAACACCCGGTGCAAGCTTGAGGTGTCCAACCTCCAGCAGCCATACATCGT  
 CAACCGCACCTTTATGCTGGCCAAGGAGGCCAGCCTTGCGA  
 TAACAACACAGATGTCCGGCTCATCGGGGAGAACTGTTCCGAGGAGTCAGTGCTAAG  
 GATCAGTGCTACCTGATGAAGCAGGTGCTCAACTTCACCCTG  
 GAAGACGTTCTGCTCCCCCAGTCAGACAGGTTCAGCCCTACATGCAGGAGGTGGTG  
 CTTTCCTGACCAAACTCAGCAATCAGCTCAGCTCCTGTACA  
 TCAGCGGTGACGACCAGAACATCCAGAAGATGTCAGAAGGCTGAAGGAGACAGTGA  
 AAAAGCTTGGAGAGAGTGGAGAGATCAAGGCGATTGGGGAAC  
 GGACCTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCTTGCGTCGCTCGAGGACCCACAATCAAG  
 CCCTGTCTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGT  
 GGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAG  
 CCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATG  
 ACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGAC  
 ACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTACGCGTGGT  
 CAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAG  
 GTCAACAACAAGACCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATC  
 TCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAG  
 AAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCA  
 CAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGC  
 TAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCTGACTCTGATGGTTC  
 TTAATTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAG  
 CTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCAC  
 ACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGA

SEQ. ID. NO. 72

Фиг. 32B



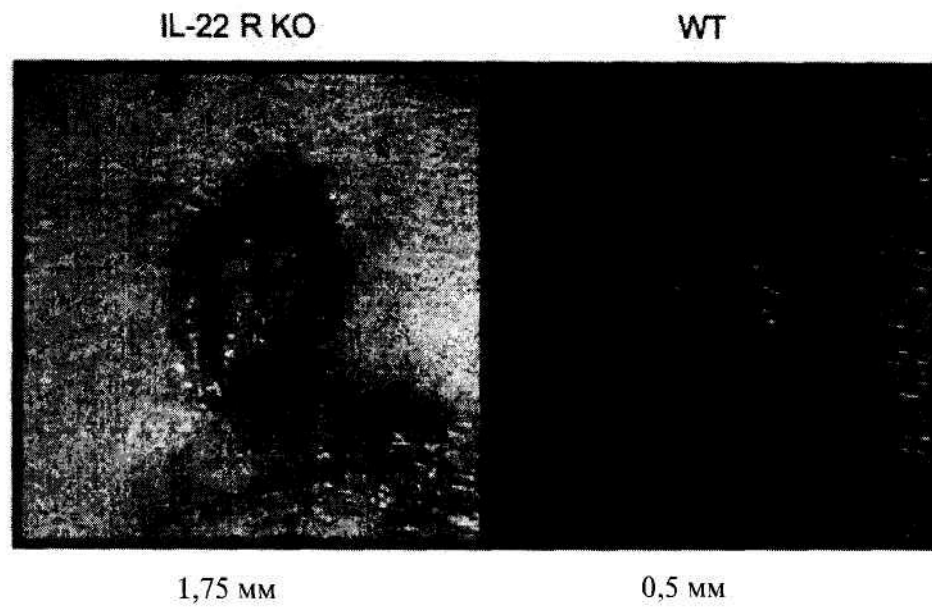
Фіг. 33



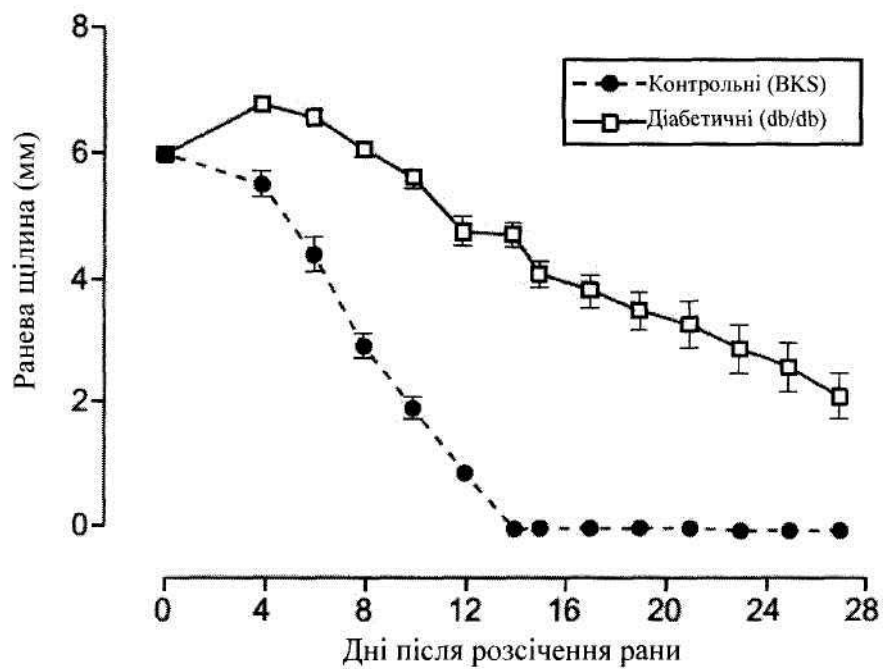
Фіг. 34А



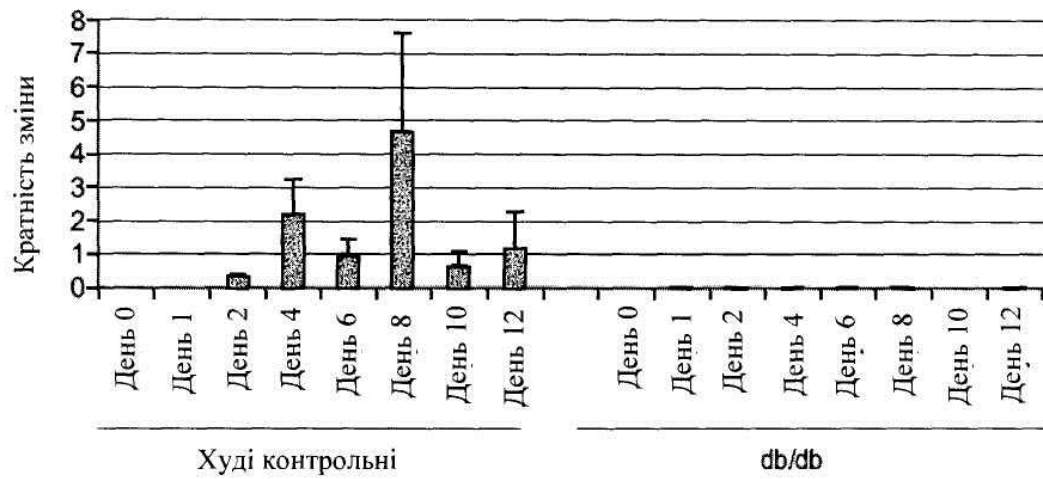




Фіг. 34D



Фіг. 35A

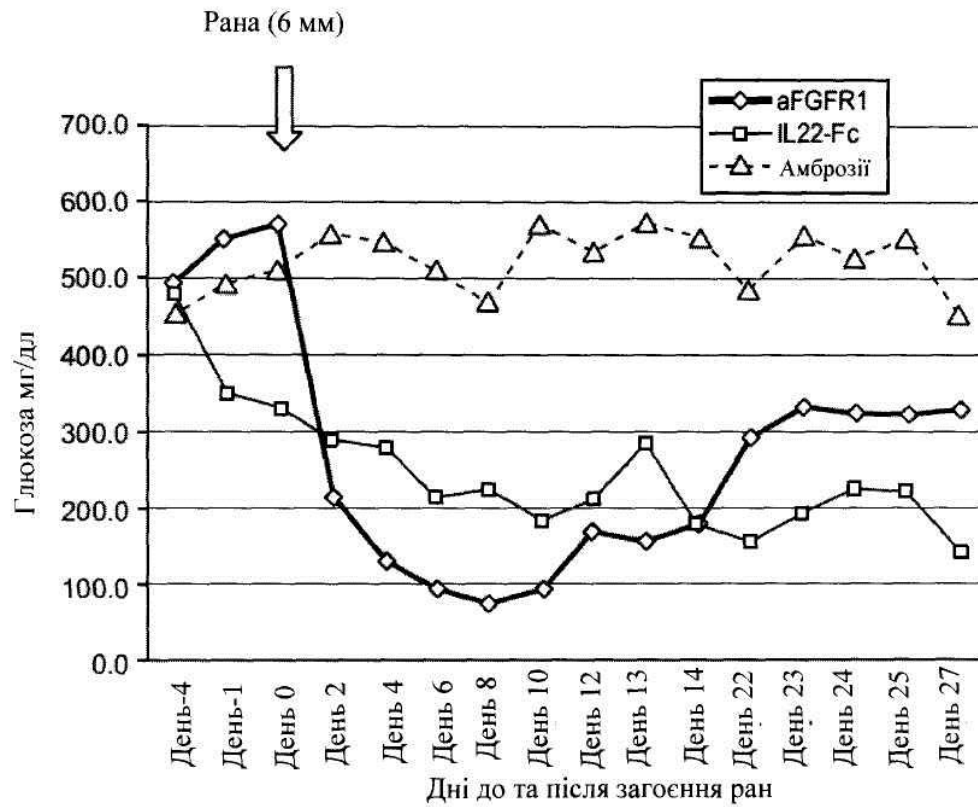


Фіг. 35В

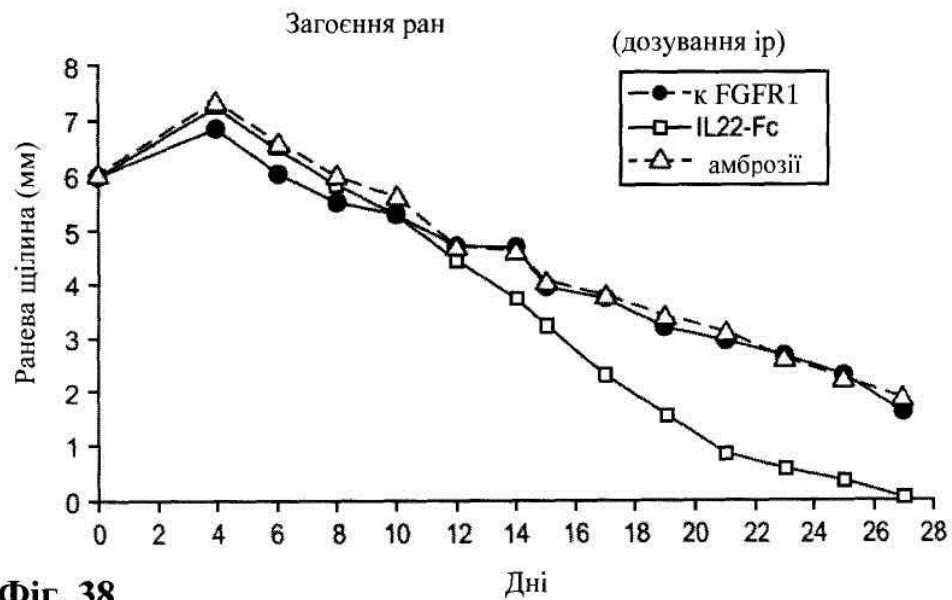
Схема експерименту



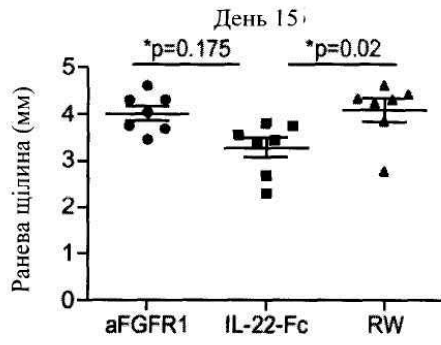
Фіг. 36



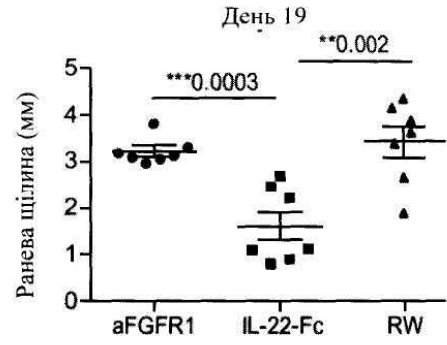
Фіг. 37



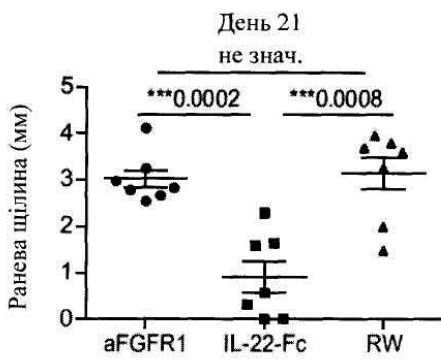
Фіг. 38



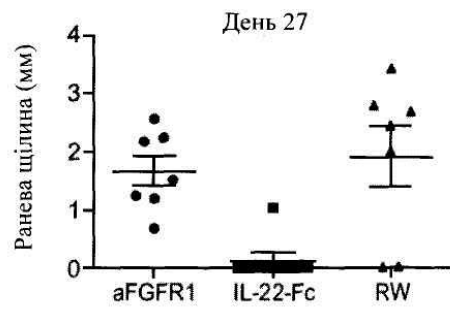
Фіг. 39А



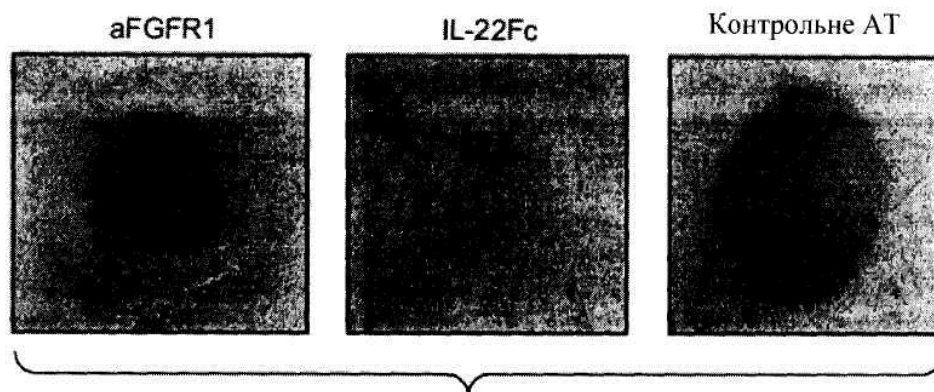
Фіг. 39В



Фіг. 39С



Фіг. 39D

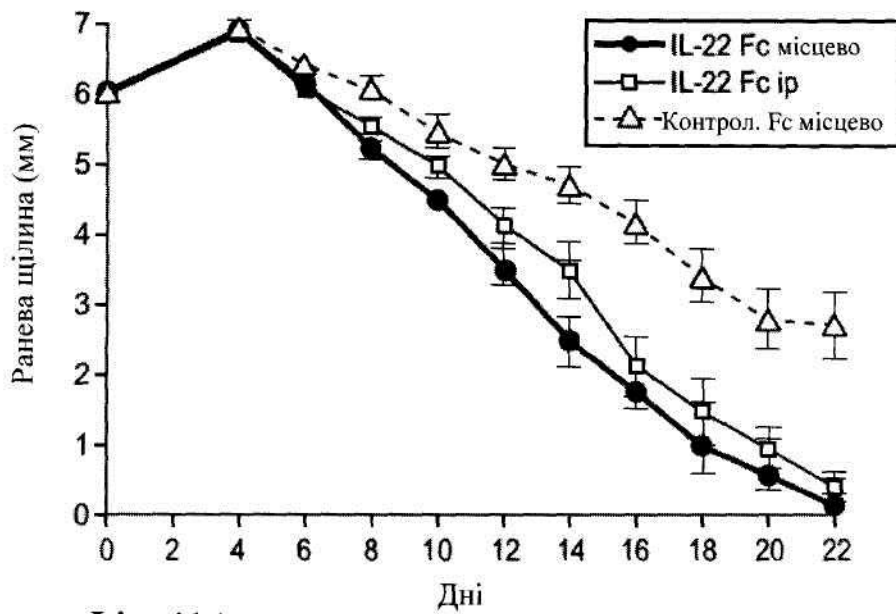


Фіг. 39Е

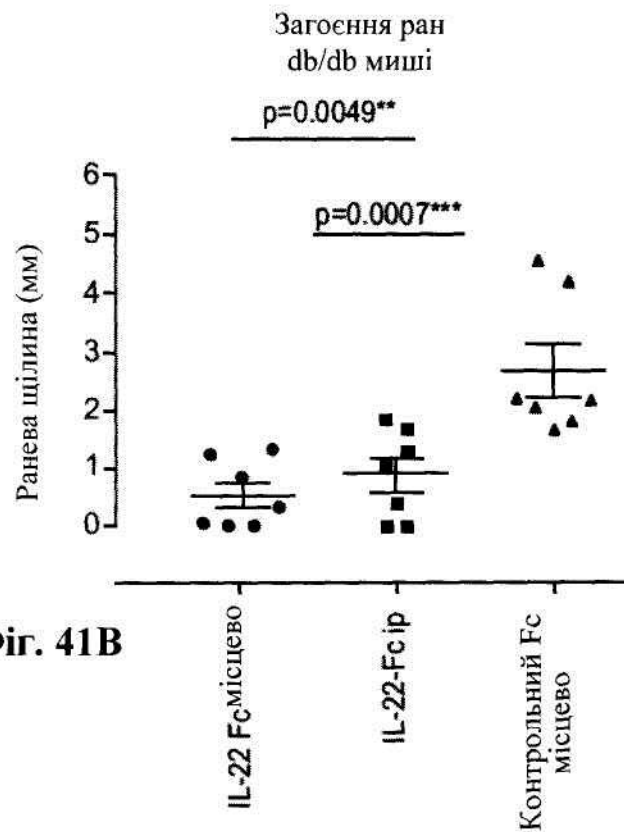
Схема експерименту



Фіг. 40



**Fig. 41A**

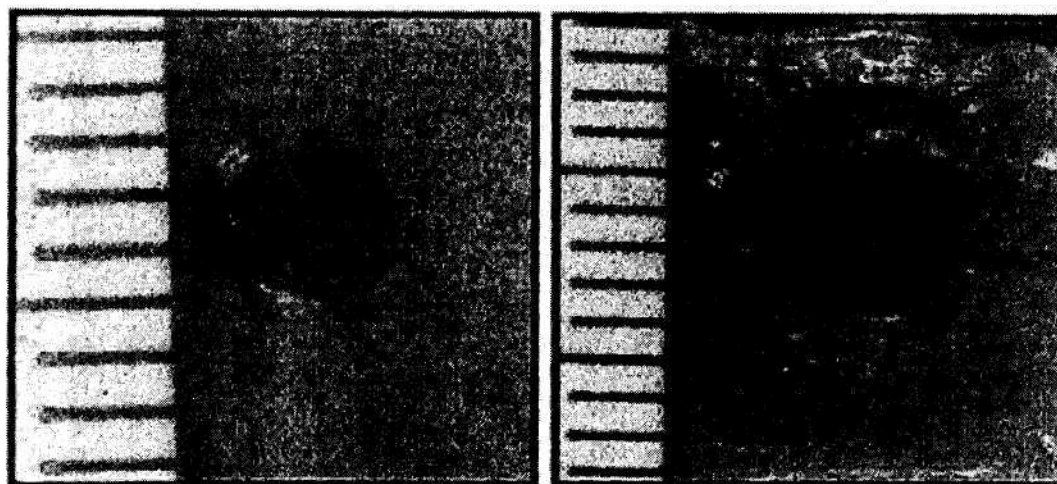


**Fig. 41B**

Контрольне антитіло:

Вигляд зверху

Вигляд ззаду

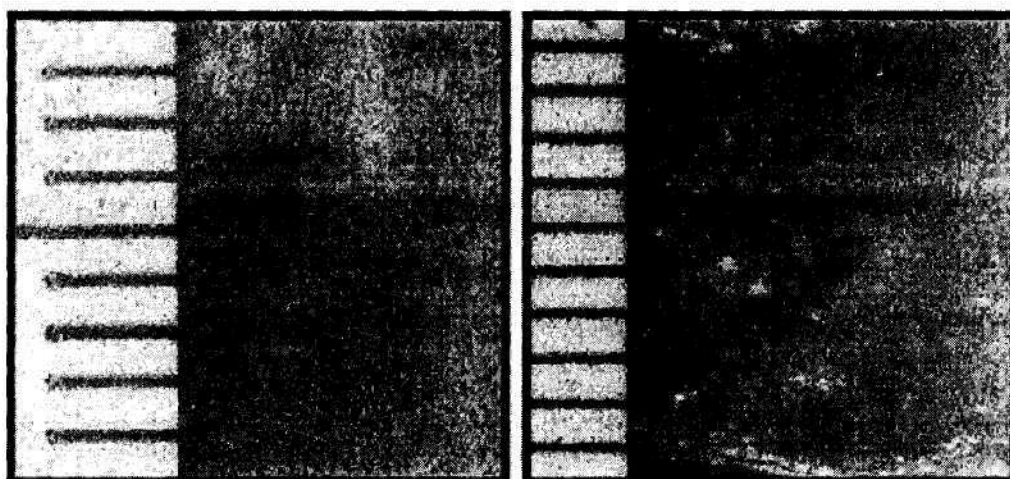


Фіг. 42А

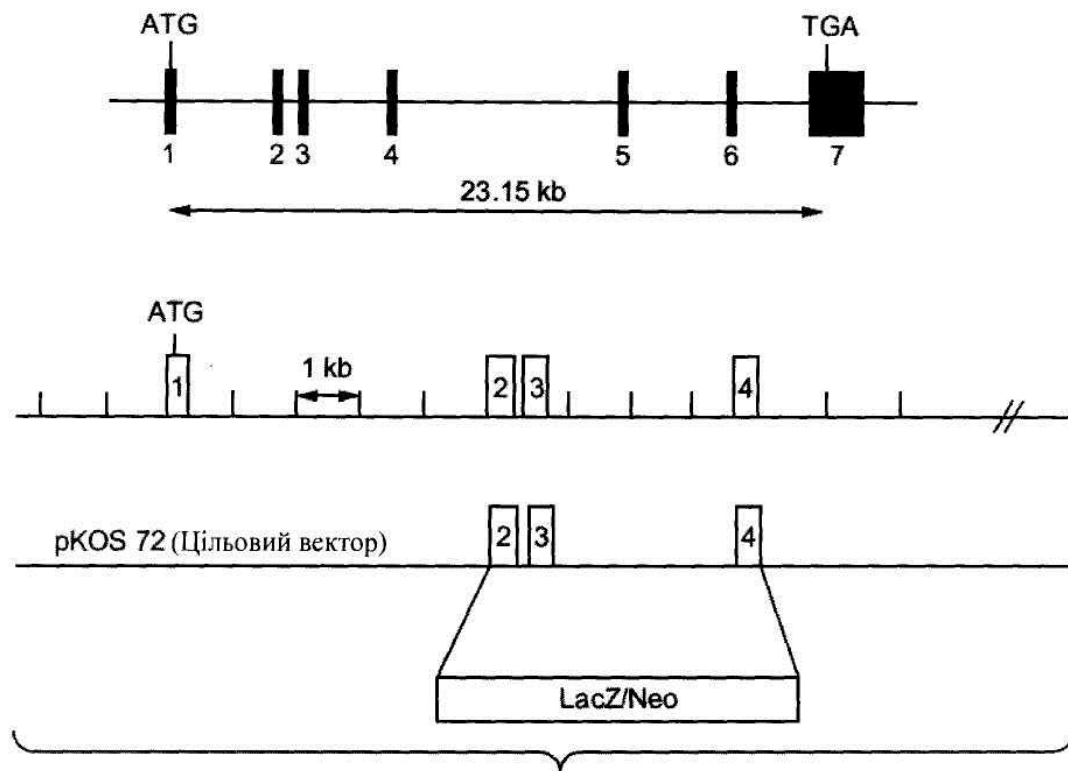
IL-22Fc:

Вигляд зверху

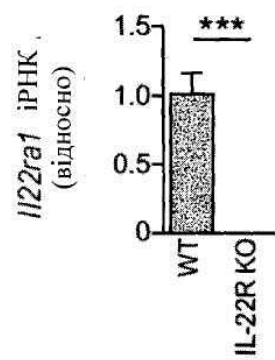
Вигляд ззаду



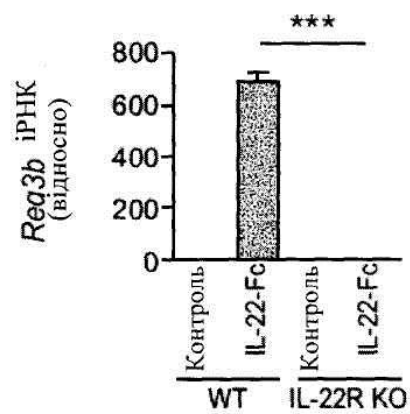
Фіг. 42В



Фиг. 43А



Фиг. 43В



Фиг. 43С



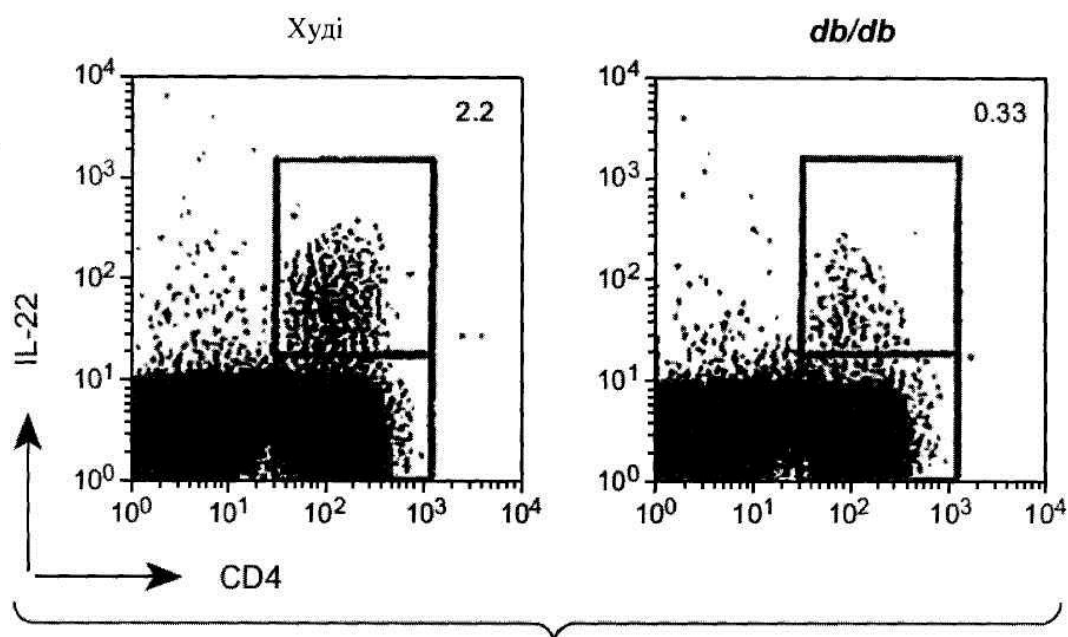


Fig. 44A

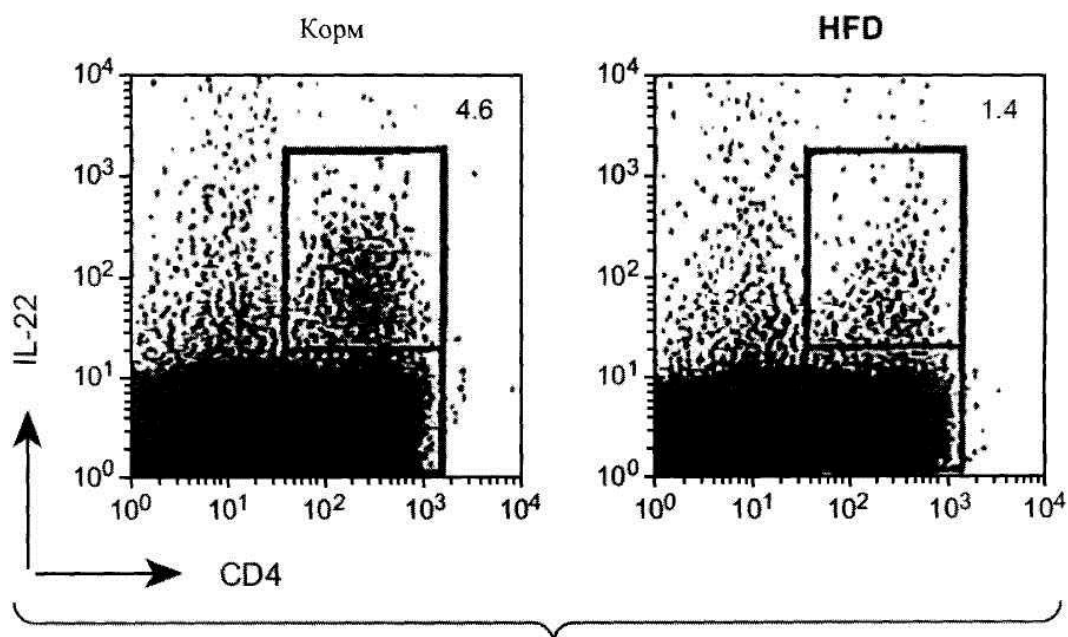
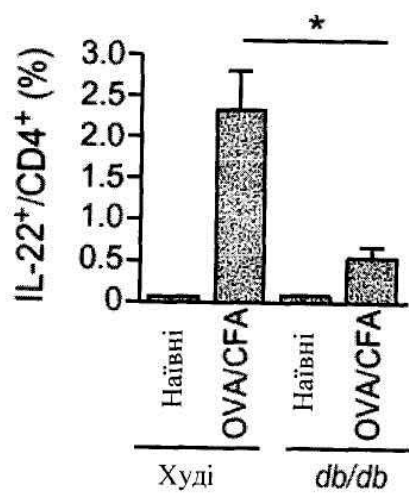
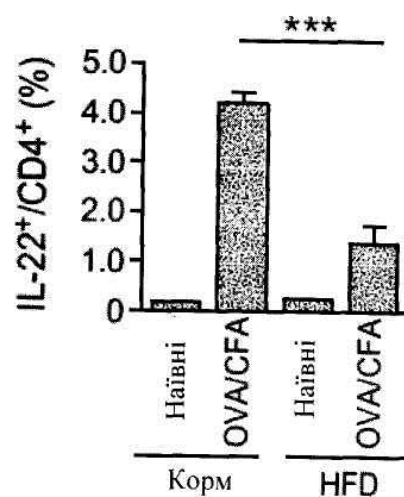


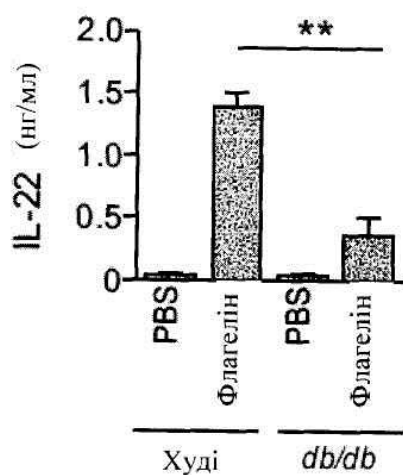
Fig. 44C



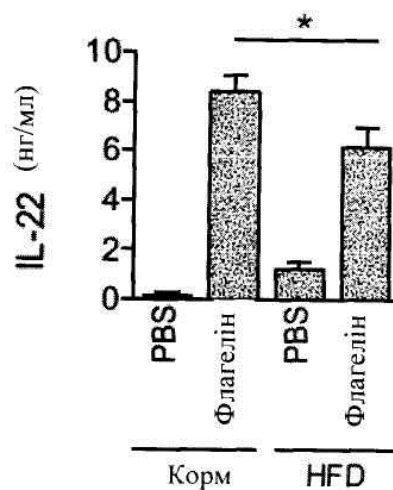
Фіг. 44В



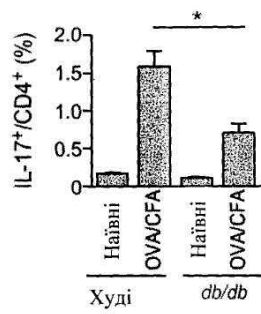
Фіг. 44Д



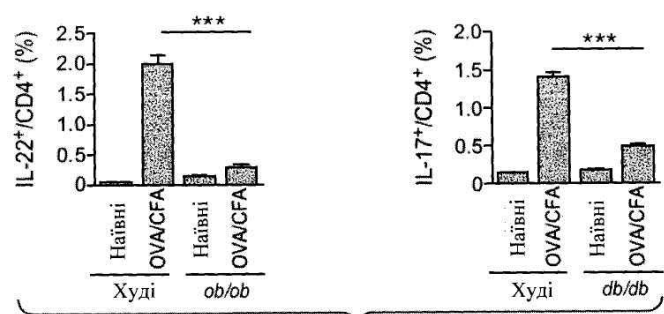
Фіг. 44Е



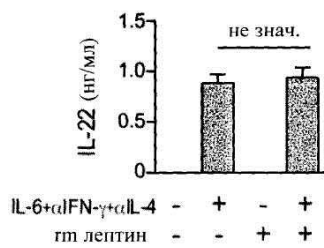
Фіг. 44Ф



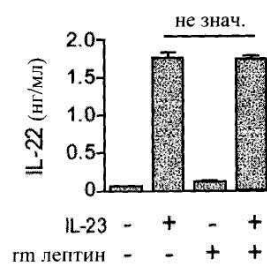
Фіг. 45А



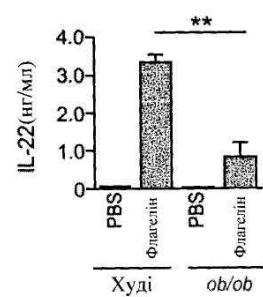
Фіг. 45В



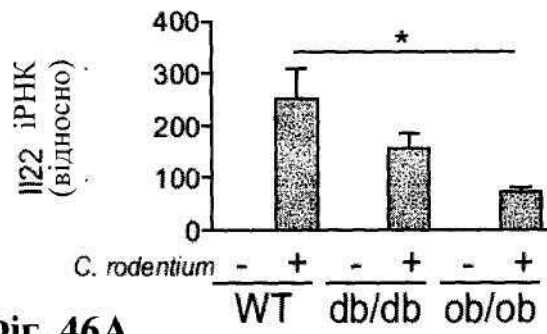
Фіг. 45С



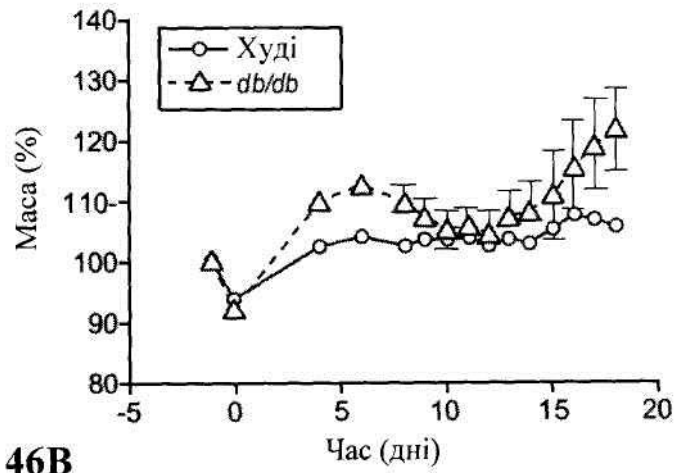
Фіг. 45D



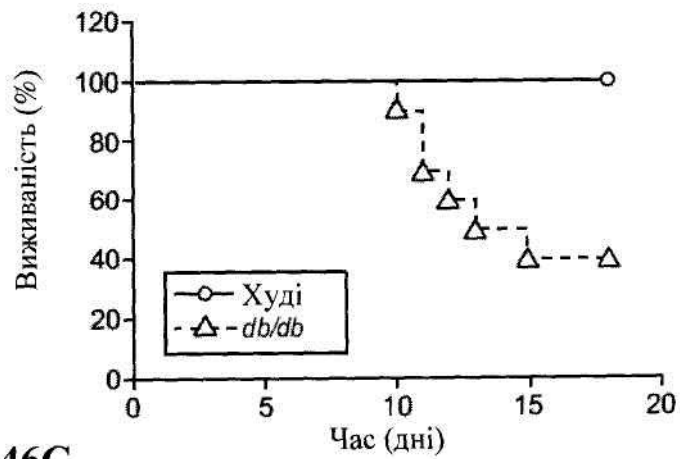
Фіг. 45Е



Фіг. 46А

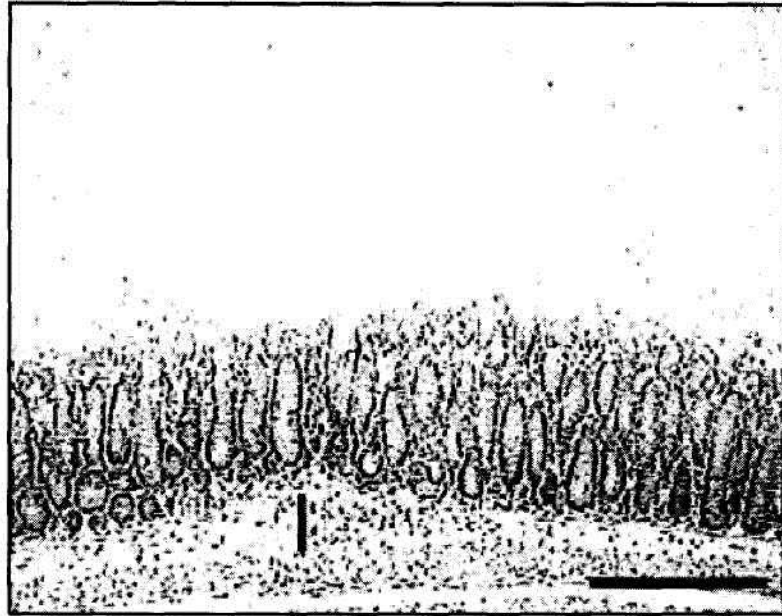


Фіг. 46В



Фіг. 46С

Худі

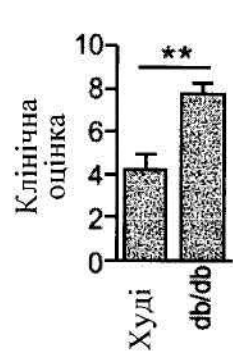


**Fig. 46D**

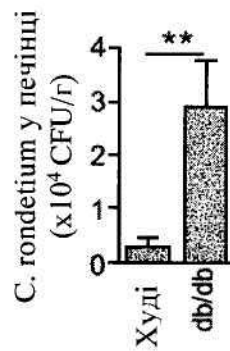
*db/db*



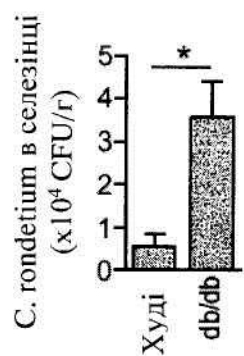
**Fig. 46E**



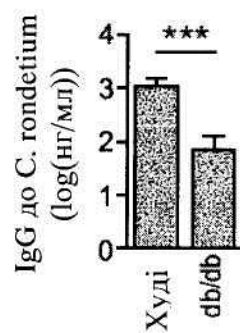
Фіг. 46F



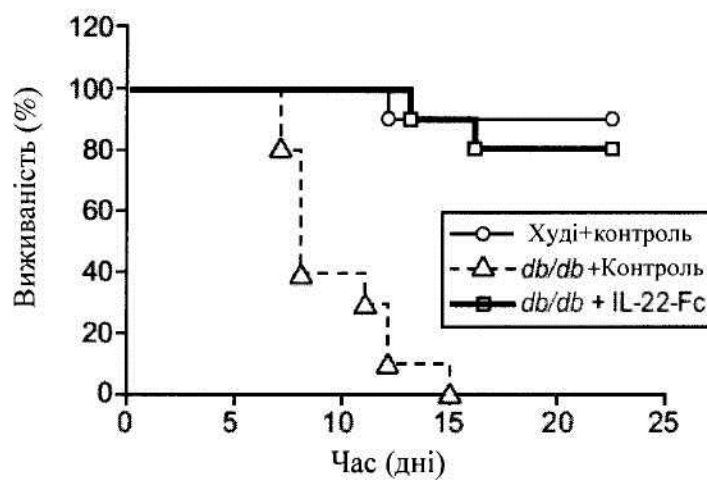
Фіг. 46G



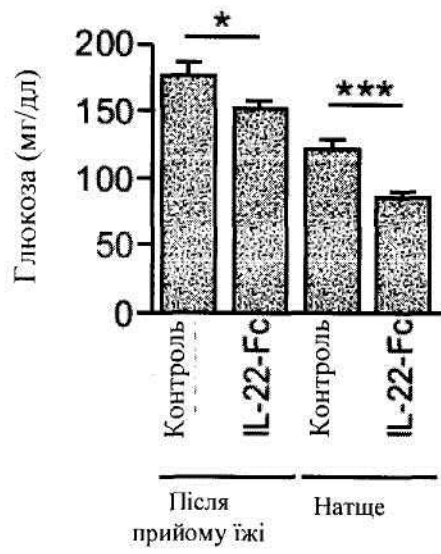
Фіг. 46H



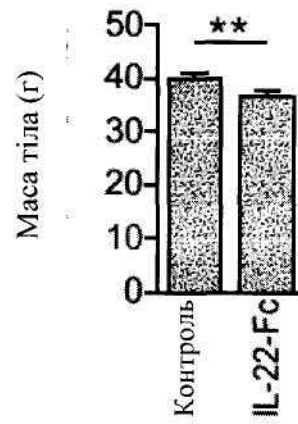
Фіг. 46I



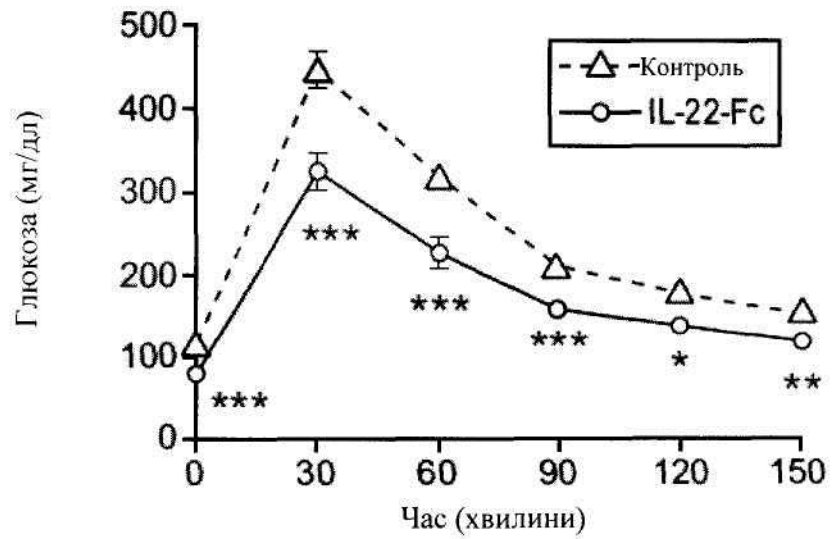
Фіг. 46J



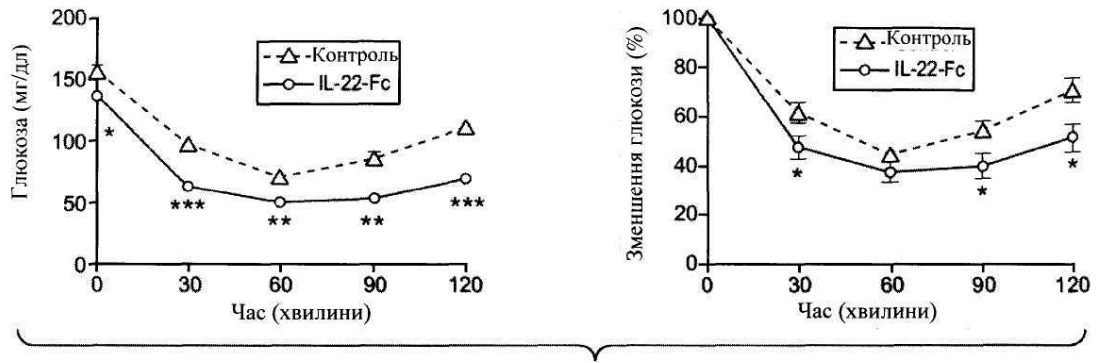
Фіг. 47А



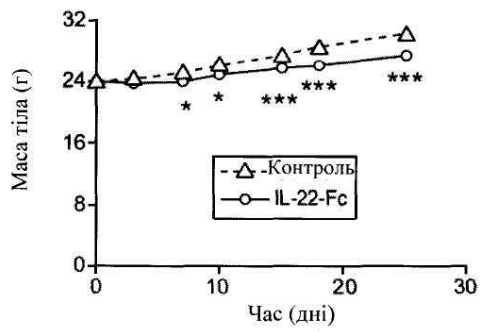
Фіг. 47В



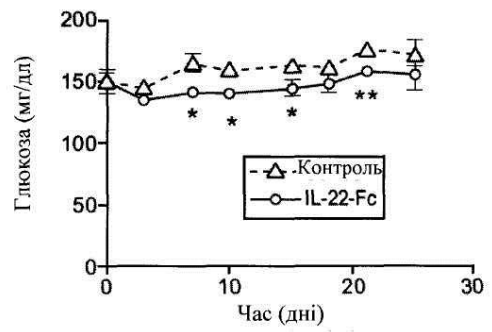
Фіг. 47В



Фіг. 47D

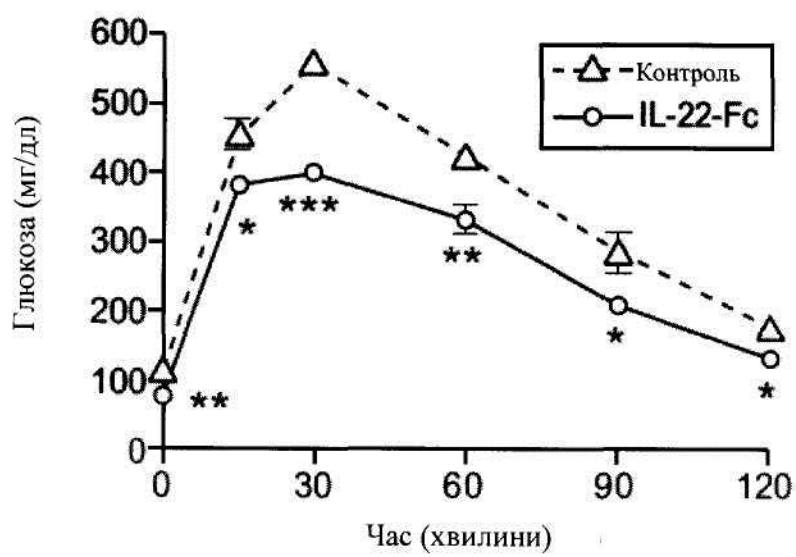


Фіг. 48A

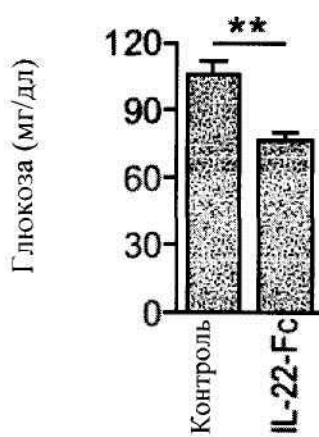


Фіг. 48B

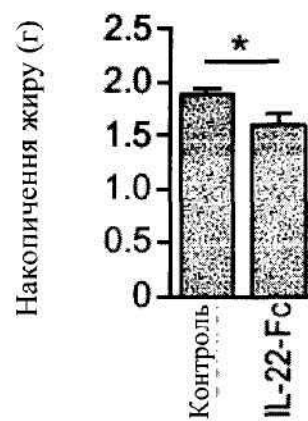




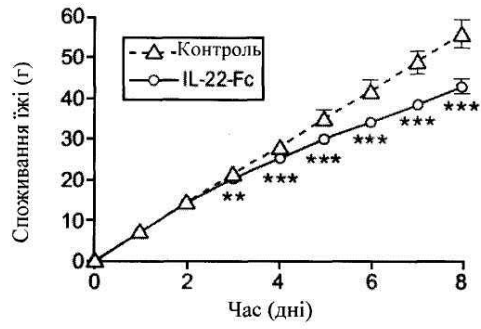
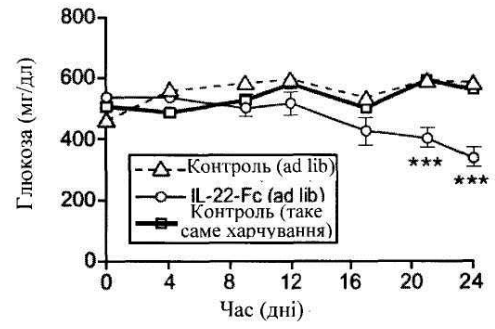
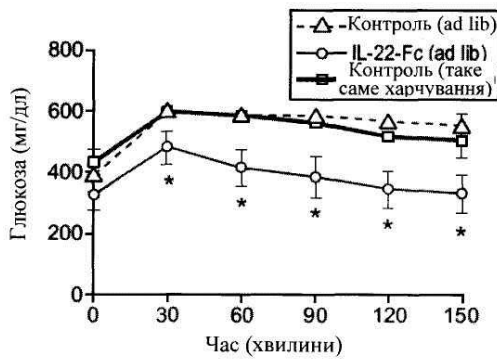
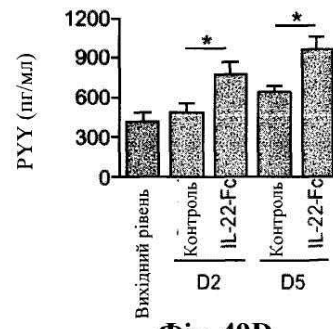
Фіг. 48С

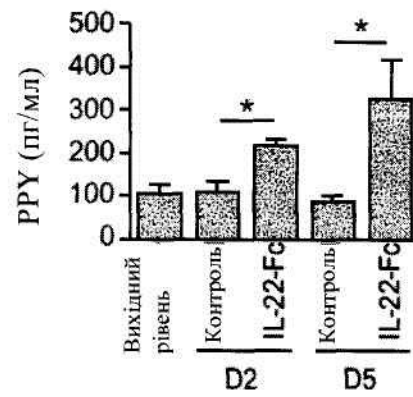


Фіг. 48D

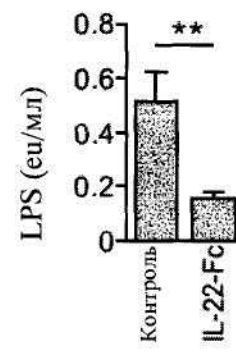


Фіг. 48Е

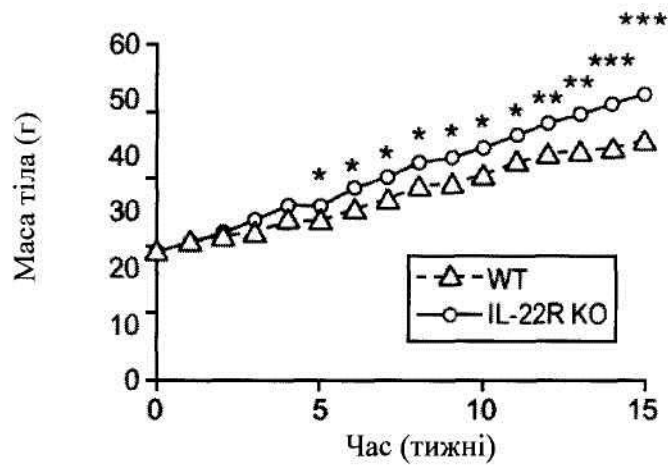

**Фіг. 49А**

**Фіг. 49В**

**Фіг. 49С**

**Фіг. 49D**



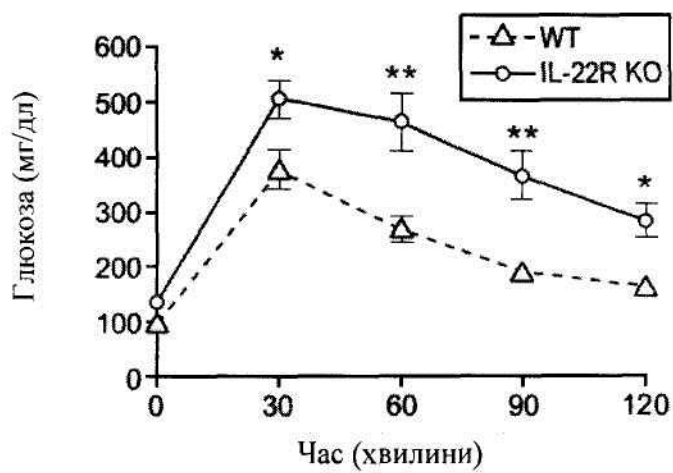
Фіг. 49Е



Фіг. 49F

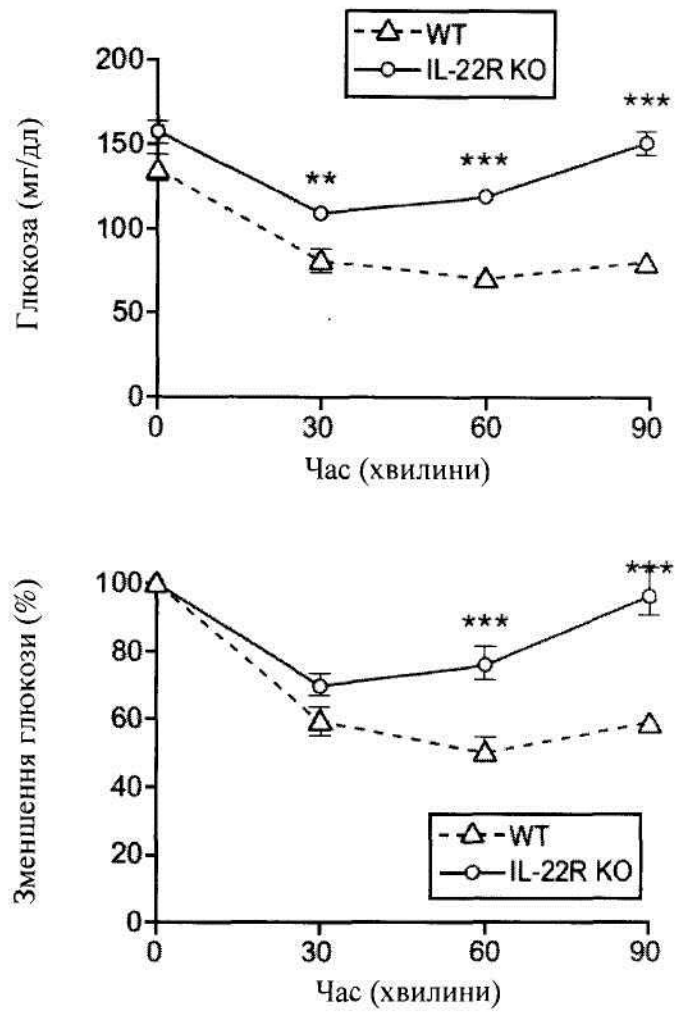


Фіг. 49G

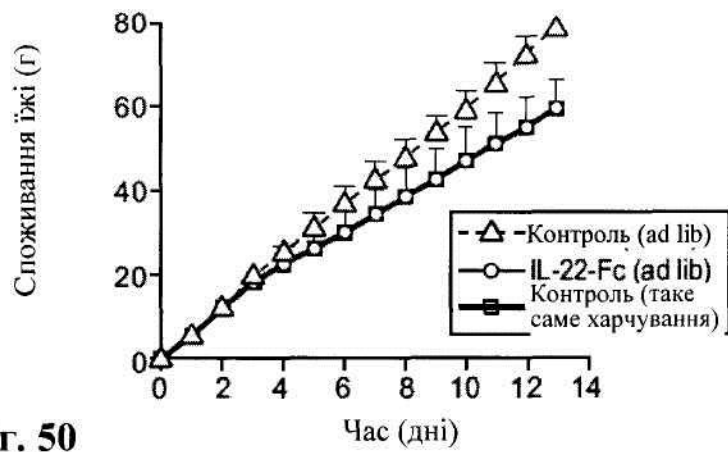


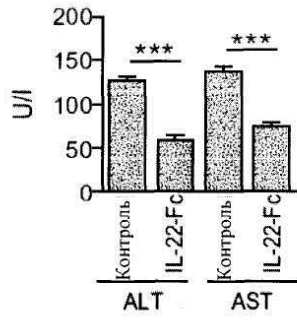
Фіг. 49H

Фіг. 49I

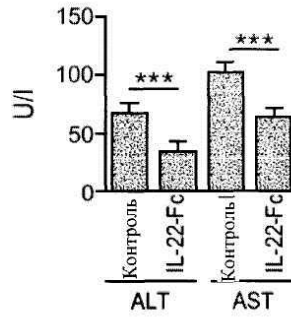


Фіг. 50

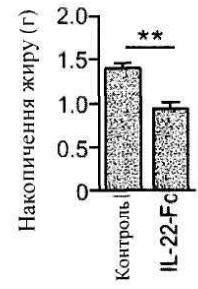




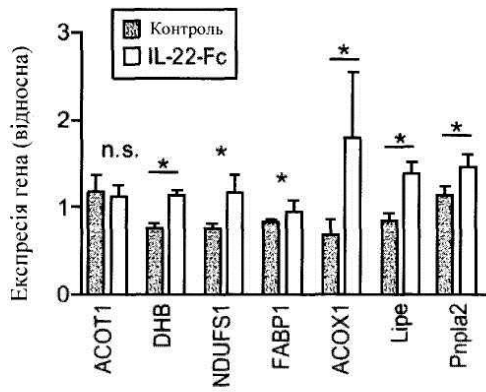
Фиг. 51А



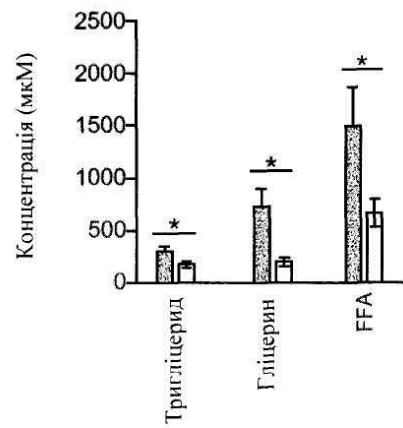
Фиг. 51В



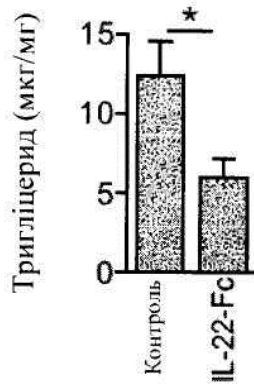
Фиг. 51С



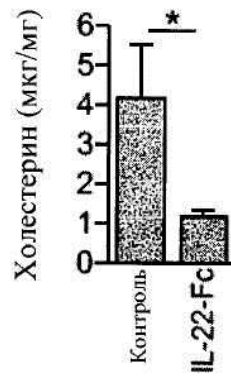
Фиг. 51D



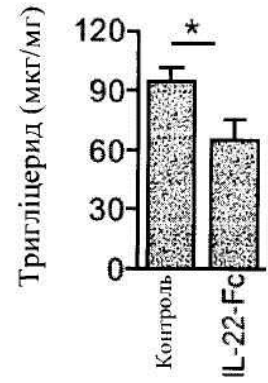
Фиг. 51Е



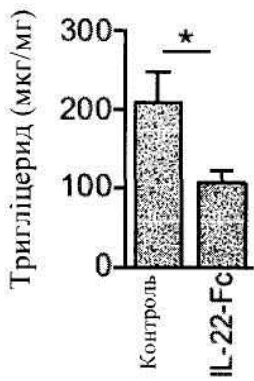
Фіг. 51F



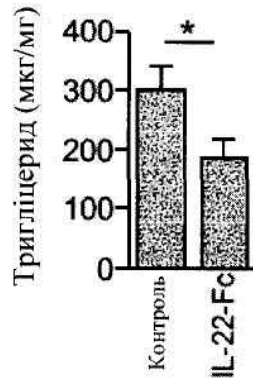
Фіг. 51G



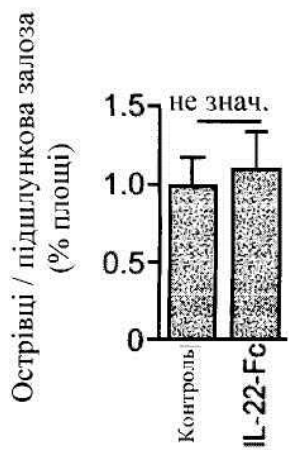
Фіг. 51H



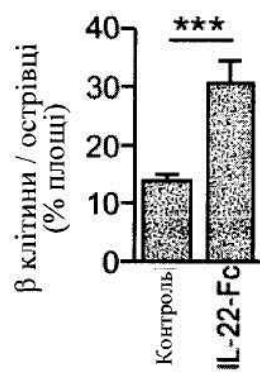
Фіг. 51I



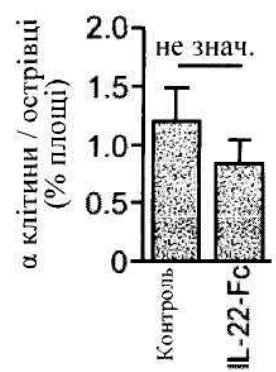
Фіг. 51J



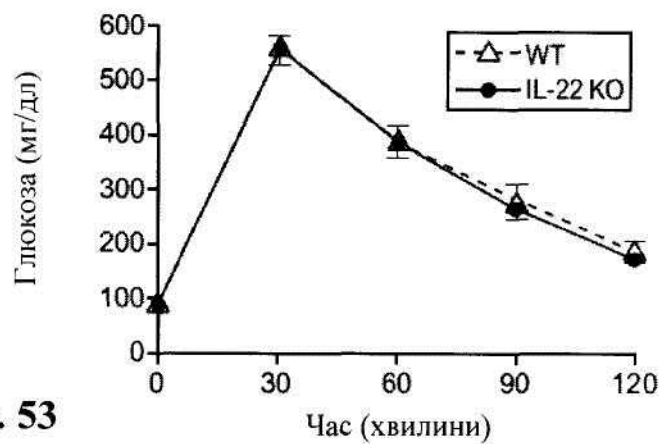
Фіг. 52A



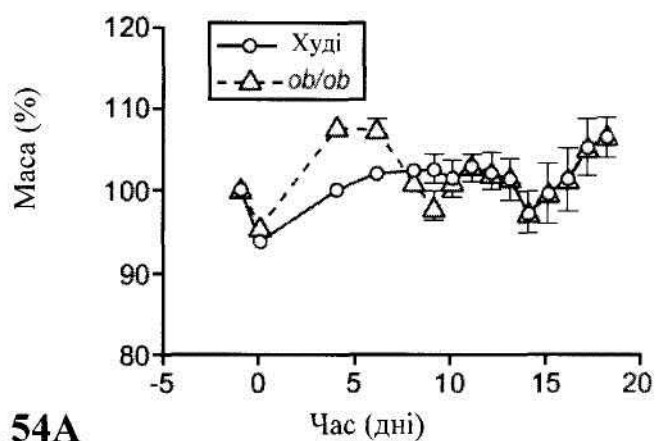
Фіг. 52B



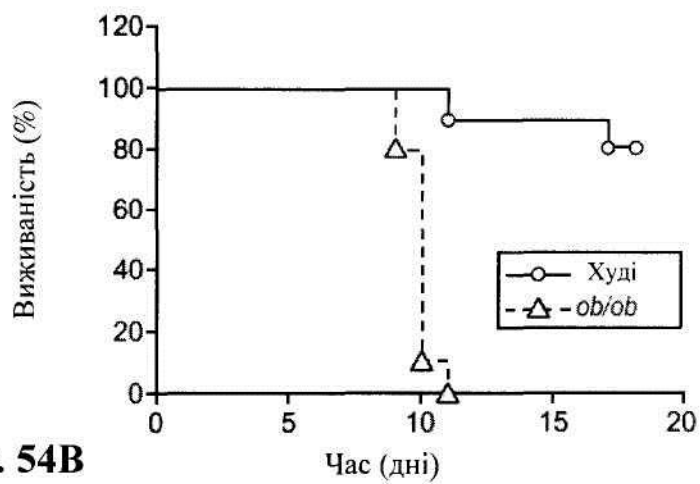
Фіг. 52C



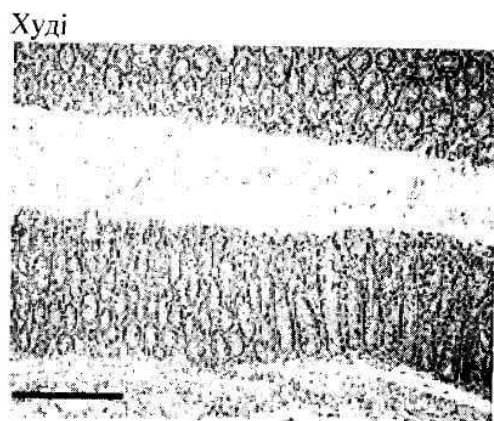
Фіг. 53



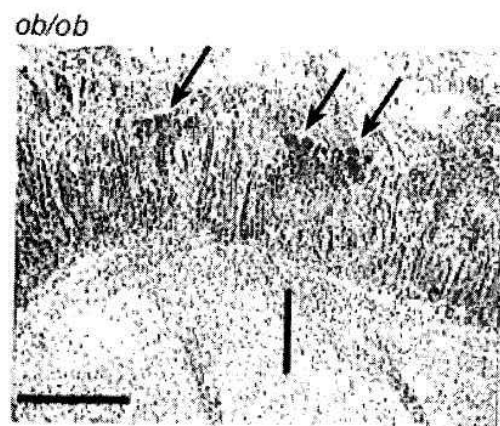
Фіг. 54А



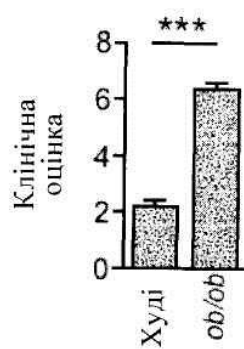
Фіг. 54В



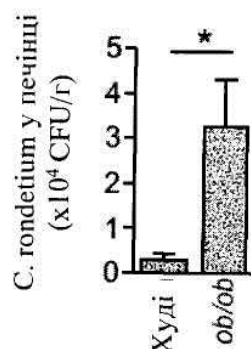
Фіг. 54C



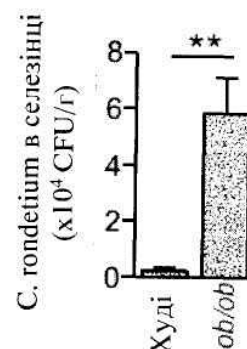
Фіг. 54D



Фіг. 54E

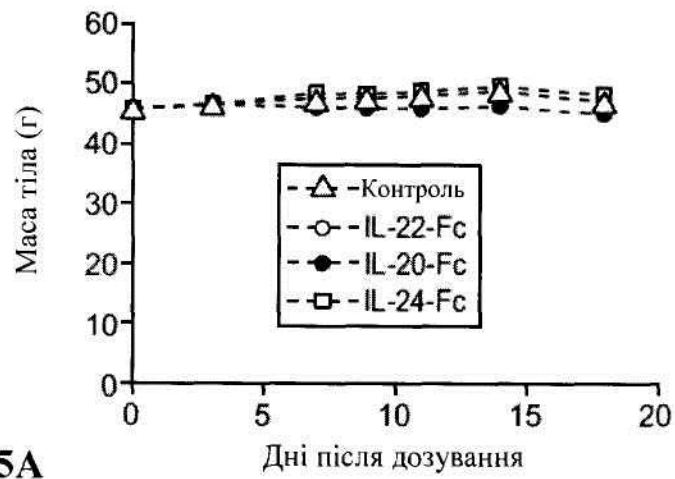


Фіг. 54F

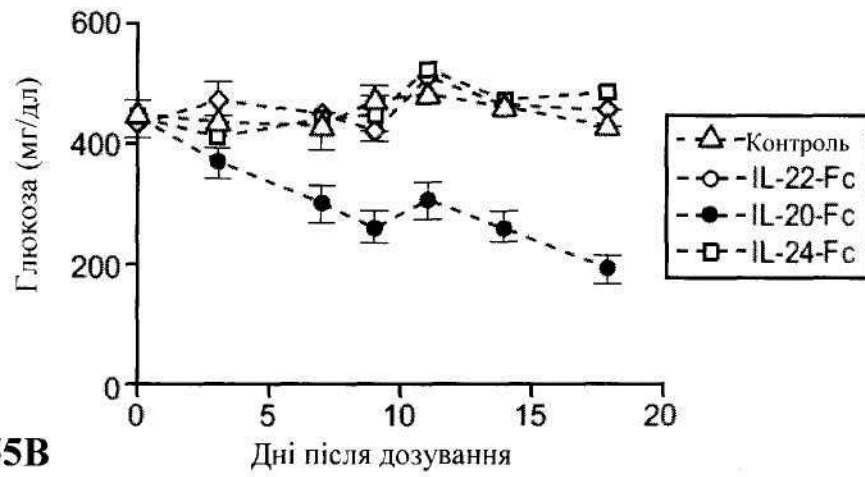


Фіг. 54G

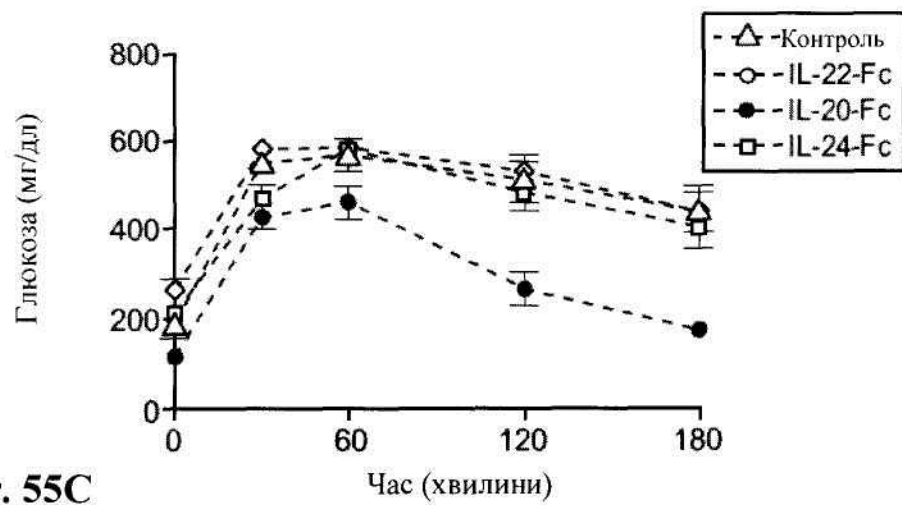




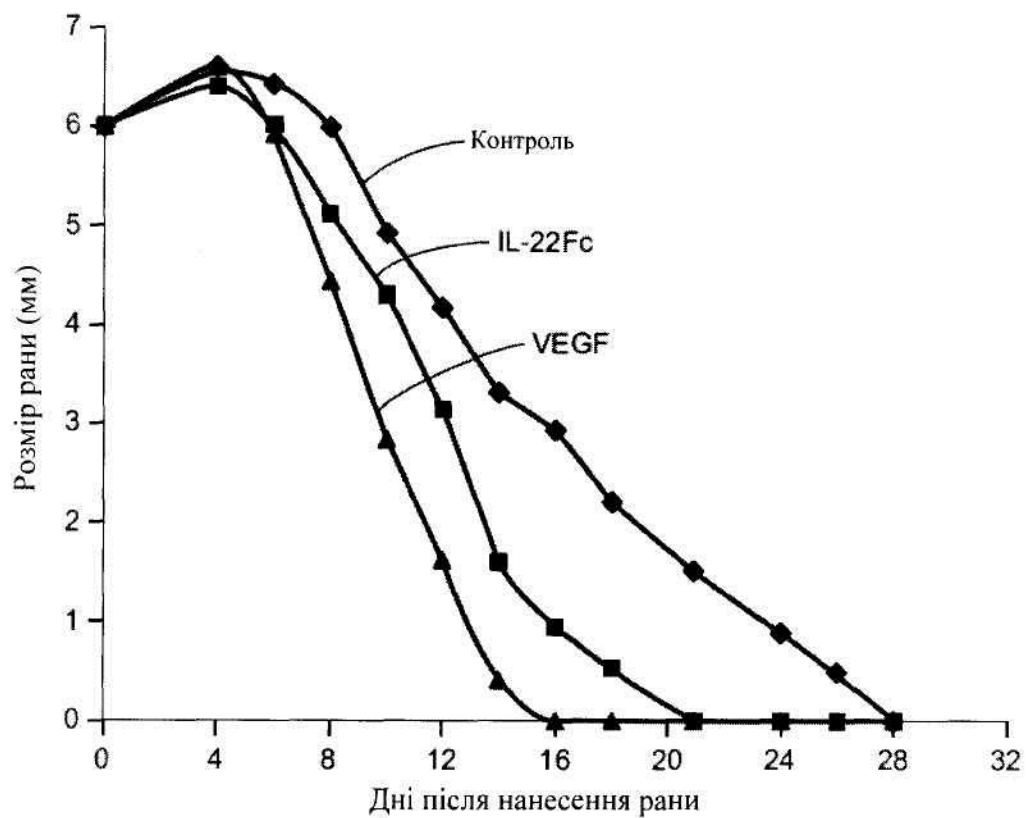
Фіг. 55А



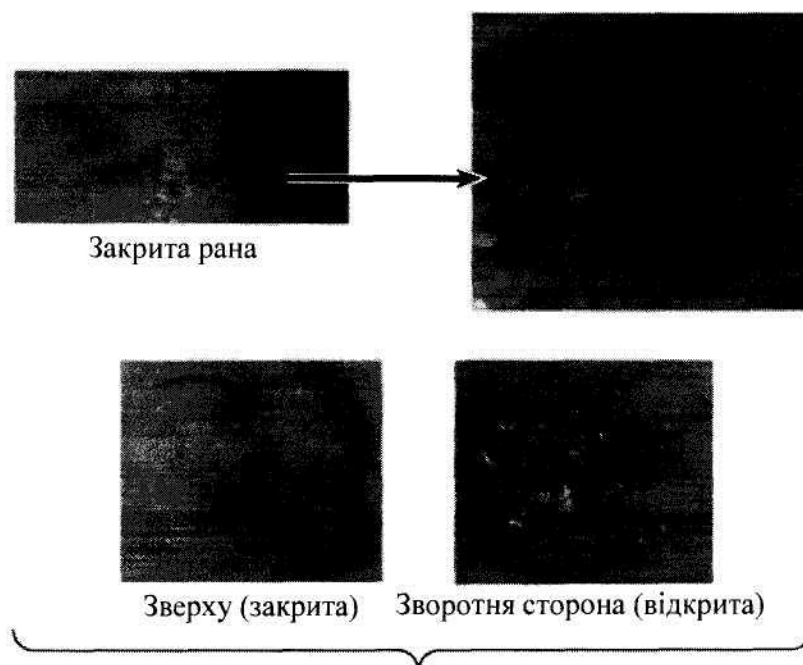
Фіг. 55В



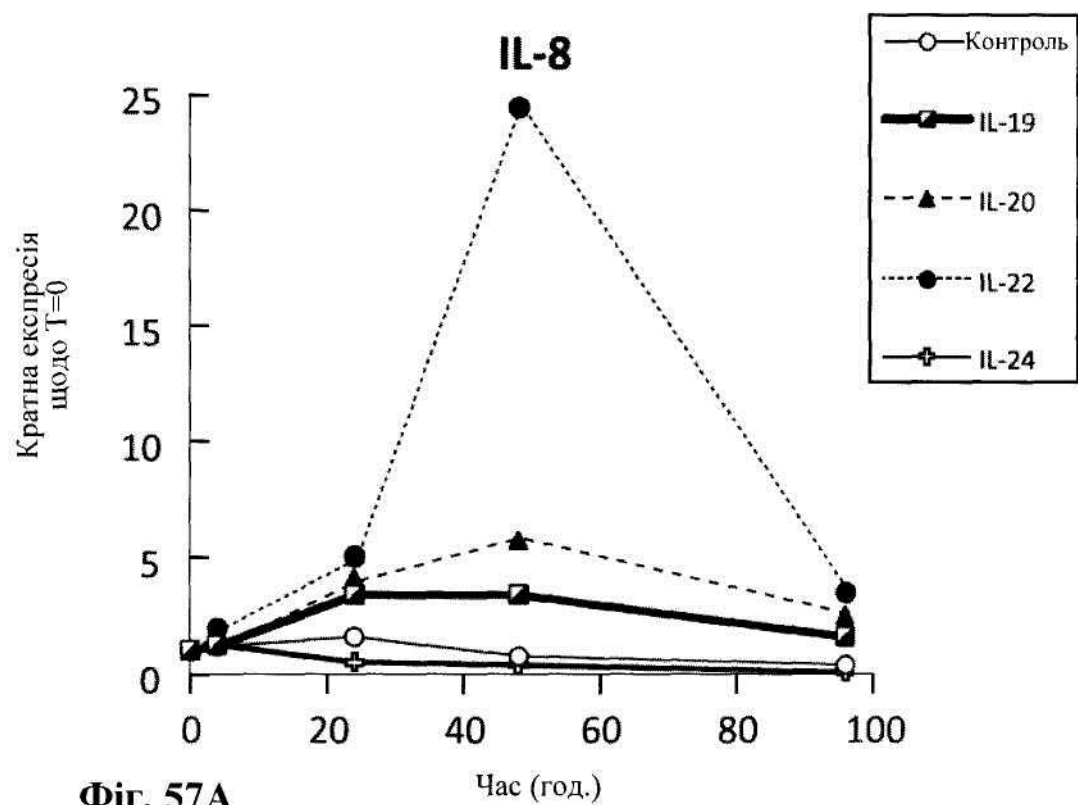
Фіг. 55С



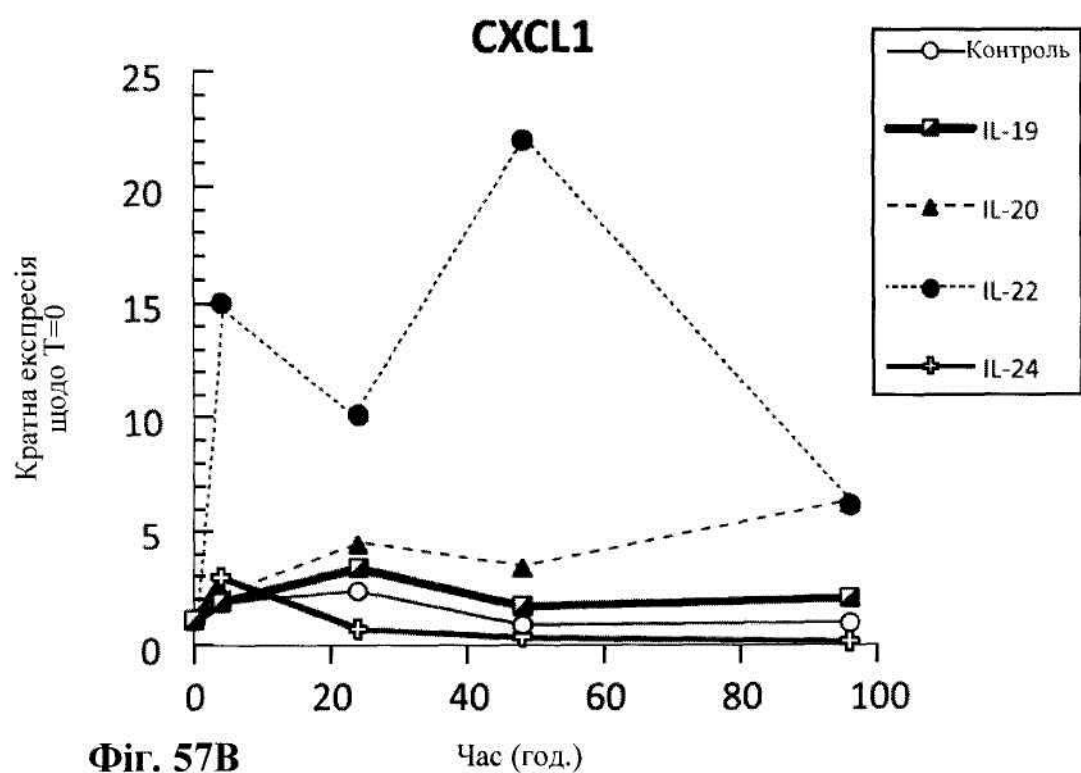
Фіг. 56А



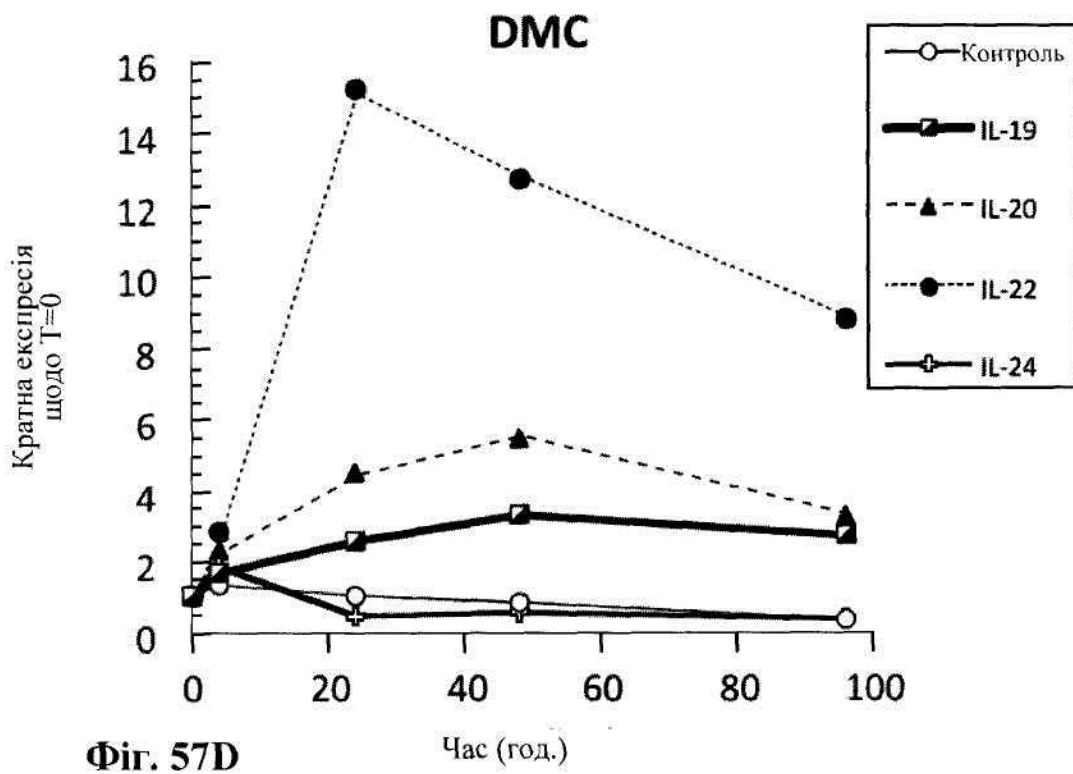
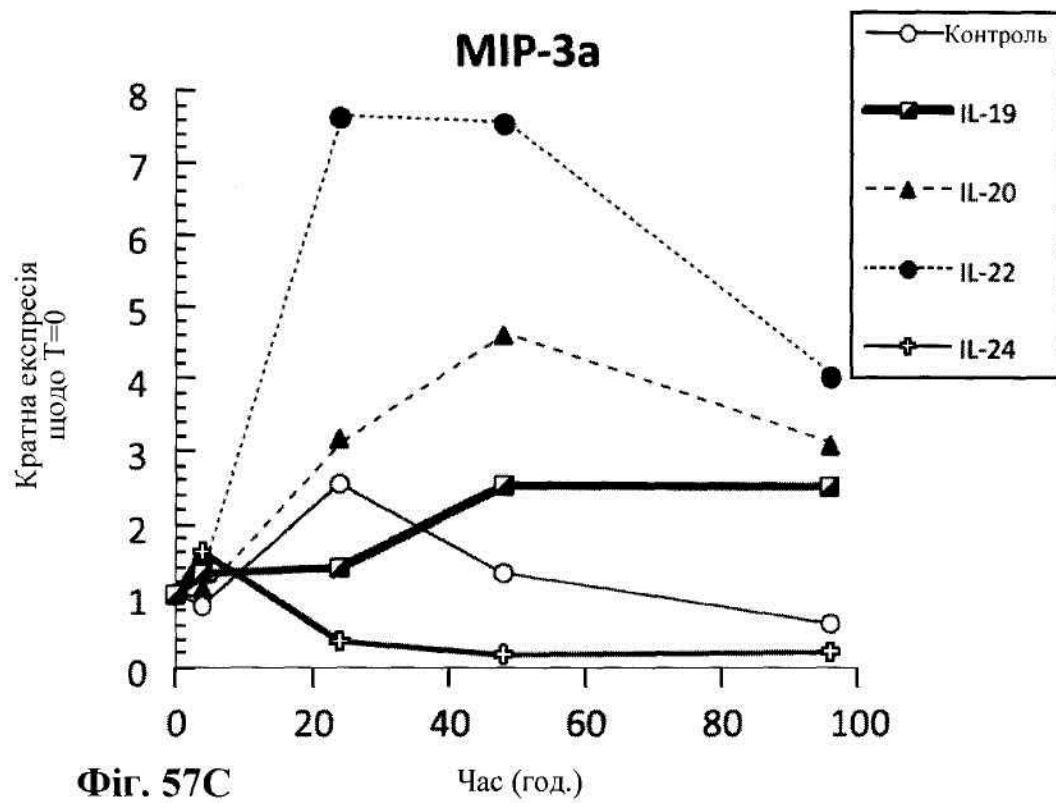
Фіг. 56В

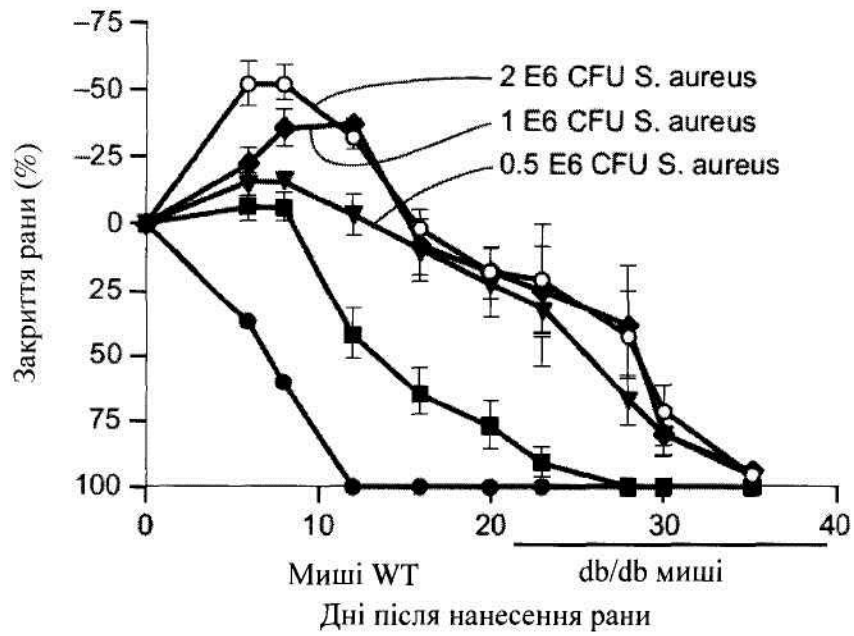
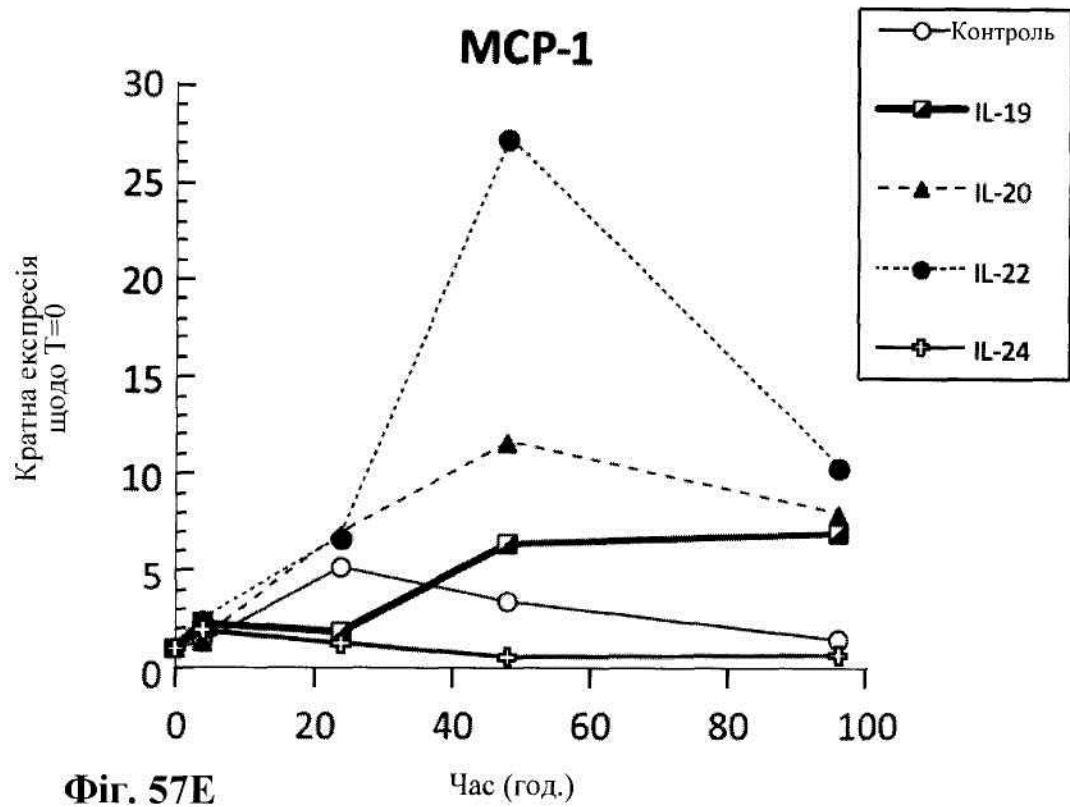


Фіг. 57А



Фіг. 57В





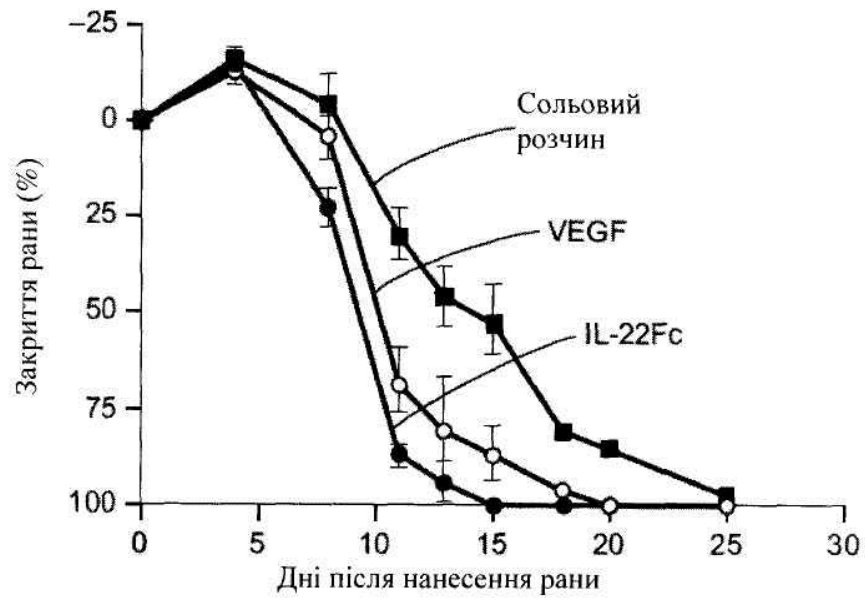


Fig. 59A

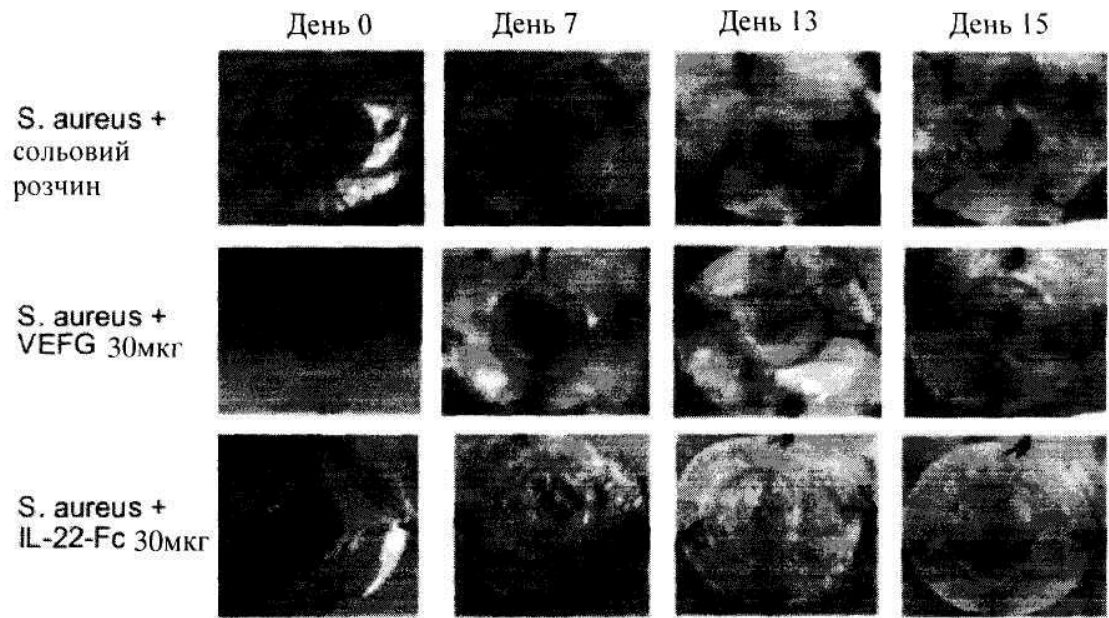
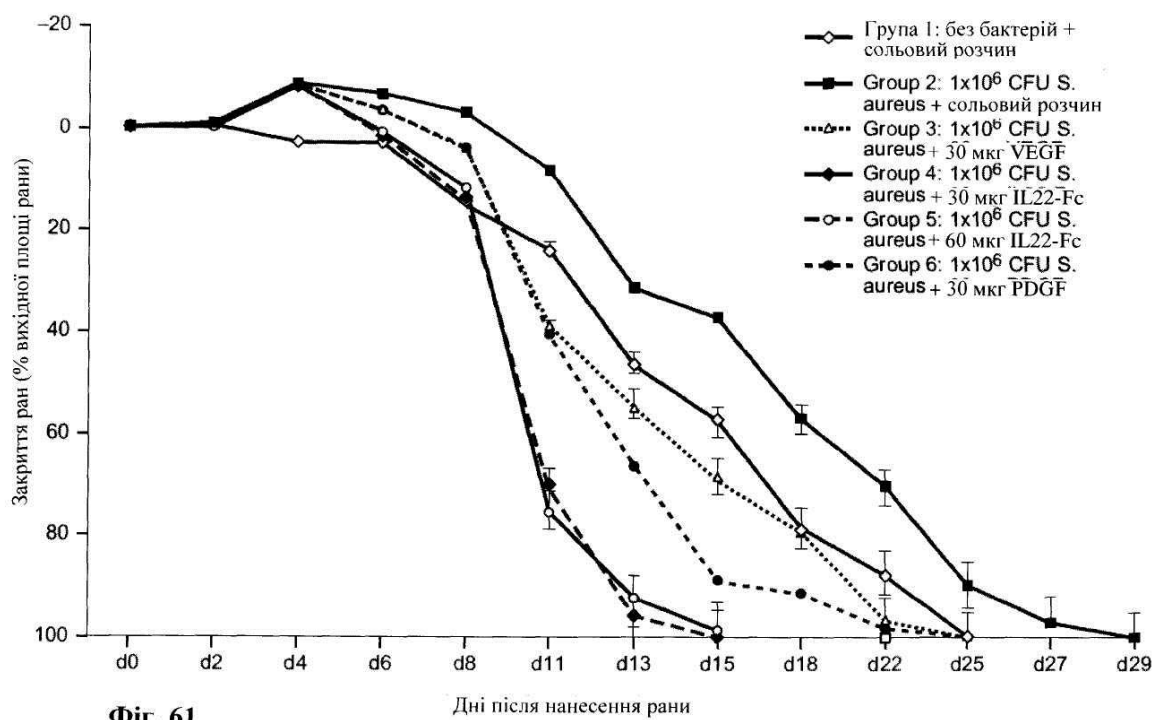
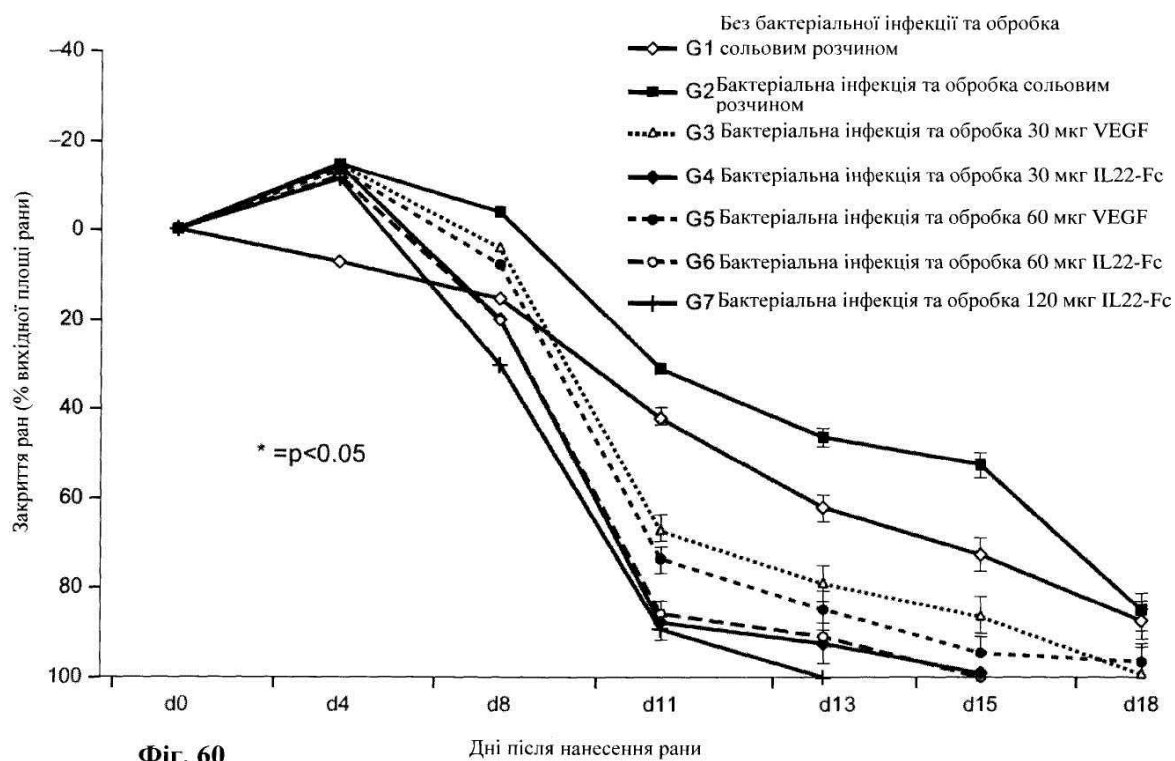
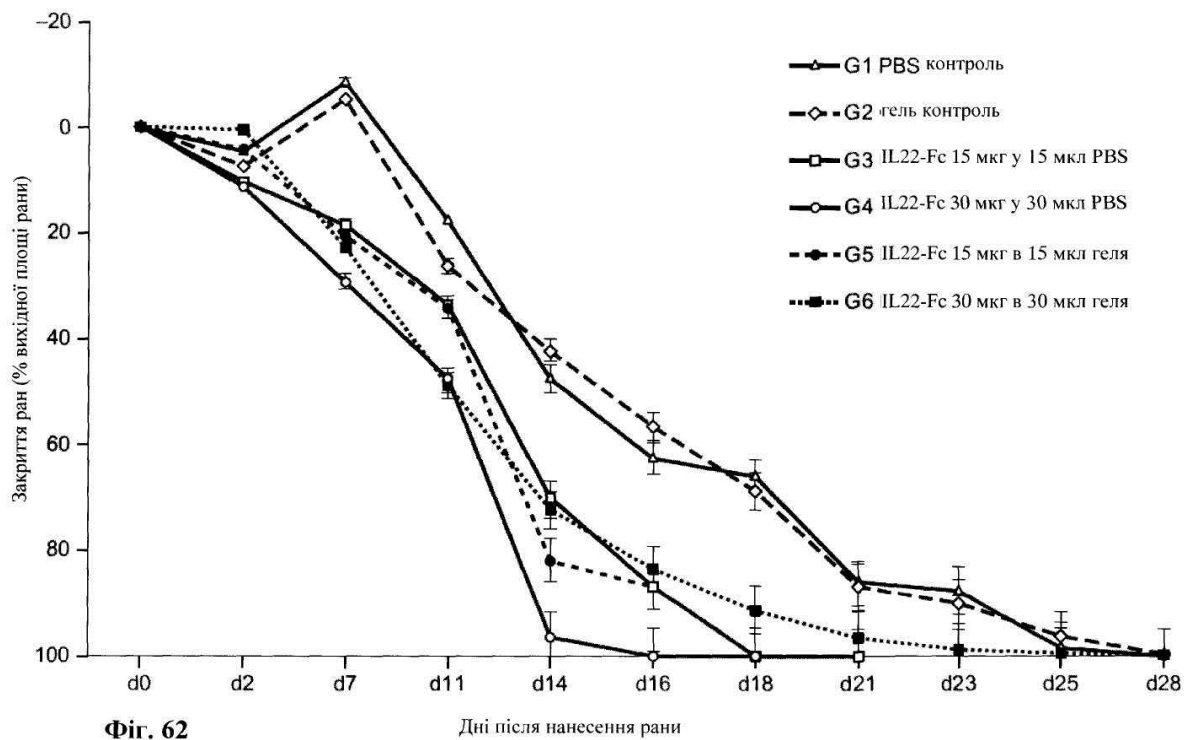


Fig. 59B





Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601