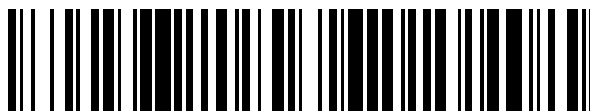


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 689**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2006 E 13150883 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2623516**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la señalización de citocinas que implican anticuerpos que se unen a IL-22 y a IL-22R**

30 Prioridad:

02.12.2005 US 741640 P

16.08.2006 US 822597 P

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

08.10.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

CHEN, YVONNE;

CHUNTHARAPAI, ANAN;

DANILENKO, DIMITRY;

OUYANG, WENJUN;

SA, SUSAN;

WALDEZ, PATRICIA;

WONG, TERENCE;

WU, JIANFENG y

ZHENG, YAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 547 689 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la señalización de citocinas que implican anticuerpos que se unen a IL-22 y a IL-22R

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N°: 60/741.640, presentada el 2 de diciembre de 2005, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/822.597, presentada el 16 de agosto de 2006, cuya divulgación se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la señalización de citocinas.

15 Antecedentes de la invención

Diversas enfermedades y trastornos están asociados con la inflamación. La inflamación es un proceso asociado con el reclutamiento de células inflamatorias (por ejemplo, leucocitos) a un sitio de lesión o infección. La inflamación generalmente protege al organismo frente a infecciones y lesiones. Sin embargo, la inflamación excesiva o inadecuada puede tener efectos perjudiciales. Los trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, a menudo desencadenan la inflamación dando como resultado la destrucción de los tejidos corporales normales. La inflamación también está relacionada con el cáncer. Véase, por ejemplo, Coussens et al. (2002) Nature 420:860-867. Por ejemplo, la inflamación crónica asociada con la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) está fuertemente correlacionada con la carcinogénesis del colon. Durante la respuesta inflamatoria, determinadas células inflamatorias producen agentes que promueven la angiogénesis, reducen la actividad antitumoral de las células T citotóxicas, en inducen mutaciones en el ADN, de este modo creando un ambiente que promueve la progresión tumoral. Id.

IL-23 es una citocina heterodimérica que desempeña un papel dominante en trastornos autoinmunitarios/inflamatorios, y en particular en la inflamación crónica. Por ejemplo, estudios en ratones han revelado que IL-23 es esencial para el desarrollo de encefalomielitis alérgica experimental (inflamación autoinmunitaria del cerebro), que es un modelo para la esclerosis múltiple; de artritis inducida por colágeno, que es un modelo para la artritis reumatoide; y de la hipersensibilidad de tipo retardado. IL-23 también funciona para mantener la colitis establecida (una forma de EII). La expresión transgénica de IL-23 da lugar a una respuesta inflamatoria sistémica, y la desregulación de IL-23 da lugar a la enfermedad eczematososa de la piel (una afección inflamatoria de la piel). IL-23 estimula a una población única de células T (células Th_{IL-17}), que a su vez inducen la producción de IL-17 y de citocinas proinflamatorias. Para una revisión de los papeles de IL-23 en la inflamación y la autoinmunidad véase, por ejemplo, Hunter (2005) Nat. Rev. Immunol. 5:521-531; y Holscher (2005) Curr. Opin. Invest. Drugs 6:489-495. También se ha demostrado que IL-23 promueve el crecimiento tumoral aumentando la angiogénesis y disminuyendo la infiltración de células T citotóxicas en el tumor. Langowski et al. (2006) Nature 442:461-465.

Los documentos WO 2005/000897 y WO 2005/10238648 describen anticuerpos que se unen a IL-22 y la capacidad de un anticuerpo anti-IL-22 para mejorar los síntomas en un modelo murino de artritis inducida por colágeno (AIC).

Sumario de la invención

Se proporcionan composiciones y métodos útiles para el diagnóstico y tratamiento de trastornos inflamatorios y trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, psoriasis) tal como se definen en las reivindicaciones. Estas y otras realizaciones de la invención se proporcionan en el presente documento. La presente invención se basa, en parte, en la dilucidación de una ruta de señalización en la que IL-23 actúa a través de IL-22 induciendo la expresión de IL-22 a partir de un subconjunto de células T colaboradoras (células Th), es decir, el linaje de Th_{IL-17}.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a IL-22, en el que el anticuerpo es (a) un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado entre 3F11.3 (N° de Referencia ATCC PTA-37312) y el hibridoma 8E11.9 (N° de Referencia ATCC PTA-7319); (b) una forma madurada por afinidad del anticuerpo de (a); (c) un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de (a) o (b); o (d) una forma humanizada del anticuerpo de (a), (b), o (c).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una secuencia nucleotídica (SEC ID N°: 1) de un ADNc que codifica una IL-22 humana nativa. La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) derivada de la secuencia codificante de la SEC ID N°: 1 mostrada en la Figura 1.

La Figura 3 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 3) de IL-22R humana nativa.

La Figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 4) de IL-22BP humana nativa.

La Figura 5 es una lista de todos los anticuerpos para IL-22 generados y sus propiedades respectivas, tal como se describe en el Ejemplo 1. La tinción intracelular se abrevia como IC.

La Figura 6 muestra que los anticuerpos anti-IL-22 son capaces de bloquear la activación de STAT3, tal como se

describe en el Ejemplo 2.

La Figura 7 muestra que tres anticuerpos específicos anti-IL-22 bloquean a IL-22 humana de manera dependiente de la dosis, tal como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 8 muestra que tres anticuerpos específicos anti-IL-22 son capaces de bloquear a IL-22 murina de manera dependiente de la dosis, tal como se describe en el Ejemplo 4.

5 La Figura 9 es un cálculo de la afinidad de los anticuerpos anti-IL-22 por IL-22 humana, tal como se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 10 muestra que los anticuerpos anti-IL-22 detectan la expresión intracelular de IL-22, tal como se describe en el Ejemplo 6.

10 La Figura 11 muestra una tinción FACS intracelular para IL-22 usando anticuerpos anti-IL-22 marcados, tal como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 12 muestra la expresión de IL-22 en células Th1 murinas determinada mediante análisis de nucleasa 5', tal como se describe en el Ejemplo 7.

La Figura 13 muestra la expresión de IL-22 en células T $\gamma\delta$ murinas determinada mediante análisis de nucleasa 5', tal como se describe en el Ejemplo 8.

15 La Figura 14 muestra la expresión de IL-22 en células T humanas activadas determinada mediante análisis de micromatriz, tal como se describe en el Ejemplo 9.

La Figura 15 muestra el nivel de expresión de IL-22 en células T mediante FACS, tal como se describe en el Ejemplo 10.

20 La Figura 16 muestra la comprobación de anticuerpos anti-IL-22R en células 293 que expresan IL-22R, tal como se describe en el Ejemplo 11.

La Figura 17 muestra que los anticuerpos anti-IL-22R pueden bloquear la expresión de la construcción indicadora de STAT3 inducida por IL-22, tal como se describe en el Ejemplo 12.

La Figura 18 muestra la expresión de IL-22R e IL-10R2 en la superficie de queratinocitos primarios, tal como se describe en el Ejemplo 13.

25 La Figura 19 muestra que IL-22 induce el engrosamiento de la epidermis humana, tal como se describe en el Ejemplo 14.

La Figura 20 muestra que IL-22 induce la expresión de citoqueratina 16, un marcador para renovación de queratinocitos, tal como se describe en el Ejemplo 14.

30 La Figura 21 muestra que el tratamiento de la epidermis humana con IL-22 causa la inducción de la expresión de psoriasisina, un gen altamente expresado en la psoriasis, tal como se describe en el Ejemplo 14.

La Figura 22 muestra que el tratamiento de queratinocitos con IL-22 eleva la expresión de varios genes, incluyendo psoriasisina, tal como se describe en el Ejemplo 15.

La Figura 23 muestra que la expresión de psoriasisina se reduce mediante tratamiento con anticuerpos anti-IL-22 y anti-IL-22R, tal como se describe en el Ejemplo 14.

35 La Figura 24 muestra que el engrosamiento epidérmico se reduce mediante tratamiento con anticuerpos anti-IL-22 y anti-IL-22R, tal como se describe en el Ejemplo 14.

La Figura 25 muestra que el engrosamiento epidérmico se reduce mediante tratamiento con anticuerpos anti-IL-22 y anti-IL-22R, tal como se describe en el Ejemplo 14.

40 La Figura 26 muestra que IL-23 e IL-12 inducen el engrosamiento epidérmico con distintas características histológicas, tal como se describe en el Ejemplo 16.

La Figura 27 muestra que IL-23 induce la expresión de IL-22, e IL-22 induce la inflamación dérmica y el engrosamiento epidérmico *in vivo*, tal como se describe en los Ejemplos 17 y 18.

La Figura 28 muestra que IL-12 e IL-23 inducen la expresión de distintos conjuntos de citocinas, tal como se describe en el Ejemplo 17.

45 La Figura 29 muestra que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IL-22 reduce significativamente la acantosis epidérmica inducida por IL-23 *in vivo*, tal como se describe en el Ejemplo 20.

La Figura 30 muestra la estrategia usada para alterar el gen de IL-22 en ratones y pruebas que confirman que la expresión de IL-22 está ausente en ratones IL-22^{-/-}, tal como se describe en el Ejemplo 20.

50 La Figura 31 muestra que la acantosis inducida por IL-23 se reduce significativamente en ratones deficientes para IL-22, tal como se describe en el Ejemplo 20.

La Figura 32 muestra que la deficiencia para IL-22 no tenía efecto en la acantosis inducida por IL-12, tal como se describe en el Ejemplo 20.

La Figura 33 muestra que IL-23 induce la producción de IL-22 a partir de varios linfocitos activados por IL-23, tal como se describe en el Ejemplo 21.

55 La Figura 34 muestra que IL-22 es una nueva citocina efectora del linaje de Th_{IL-17}, tal como se describe en el Ejemplo 22.

La Figura 35 muestra que IL-22 e IL-17 se producen por el mismo linaje de Th (Th_{IL-17}), tal como se describe en el Ejemplo 22.

60 La Figura 36 muestra que IL-23 estimula la producción de IL-22 tras la activación de células T no expuestas previamente, tal como se describe en el Ejemplo 22.

La Figura 37 muestra que IL-19, IL-20, IL-22, e IL-24 inducen el engrosamiento epidérmico, tal como se describe en el Ejemplo 23.

La Figura 38 muestra la cuantificación de la acantosis epidérmica inducida por IL-19, IL-20, IL-22, e IL-24, tal como se describe en el Ejemplo 23.

65 La Figura 39 muestra que los componentes de los receptores para IL-19, IL-20, e IL-22 se expresan en

queratinocitos humanos, tal como se describe en el Ejemplo 24.

La Figura 40 muestra que los anticuerpos bloqueantes para los componentes de los receptores para IL-19, IL-20, e IL-22 reducen la expresión de psoriasis, tal como se describe en el Ejemplo 24.

5 La Figura 41 muestra que los anticuerpos para IL-20Ra e IL-22R, cuando se usan en combinación, bloquean de manera eficaz la expresión de psoriasis inducida por IL-20.

Descripción detallada de realizaciones

I. DEFINICIONES

10 La expresión "polipéptido de IL-22" o el término "IL-22" se refiere a varios polipéptidos de interleucina-22 (también citados como "ligando de interleucina-22" o "IL-22L" en la técnica). El término abarca polipéptidos de IL-22 de secuencia nativa y derivados de los mismos (que se definen adicionalmente en el presente documento). Los polipéptidos de IL-22 descritos en el presente documento pueden aislarse a partir de diversas fuentes, tales como a partir de tejido humano o de otra fuente, o preparados mediante métodos recombinantes o sintéticos. Una IL-22 nativa puede ser de cualquier especie, por ejemplo, murina ("mIL-22") o humana ("hIL-22").

20 La expresión "polipéptido de IL-22R" o el término "IL-22R" se refiere a un componente polipeptídico de un heterodímero de receptor de interleucina-22 o a un heterodímero de receptor de interleucina-20. El término abarca polipéptidos de IL-22R de secuencia nativa y derivados de los mismos (que se definen adicionalmente en el presente documento). Los polipéptidos de IL-22R descritos en el presente documento pueden aislarse a partir de diversas fuentes, tales como a partir de tejido humano o de otra fuente, o preparados mediante métodos recombinantes o sintéticos. Una IL-22R nativa puede ser de cualquier especie, por ejemplo, murina ("mIL-22R") o humana ("hIL-22R"). Los polipéptidos de IL-22R de secuencia nativa también se citan en la técnica como "IL-22R1" e "IL22RA".

25 Un "polipéptido de IL-22 de secuencia nativa" o un "polipéptido de IL-22R de secuencia nativa" se refieren a un polipéptido que comprende la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de IL-22 o de IL-22R correspondiente procedente de la naturaleza. Dichos polipéptidos de IL-22 o IL-22R de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. Los términos abarcan específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido de IL-22 o IL-22R específico (por ejemplo, una IL-22 que carece de su péptido de señal asociado), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo), y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. En varias realizaciones de la invención, los polipéptidos de IL-22 o IL-22R de secuencia nativa divulgados en el presente documento son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa. Las Figuras 2 y 3 muestran IL-22 e IL-22R humanos de longitud completa ejemplares, respectivamente. En la Figura 1 se muestra un ácido nucleico que codifica el polipéptido mostrado en la Figura 2. Los codones de inicio y de parada se muestran en fuente negra y subrayados en esa figura. Aunque las secuencias polipeptídicas de IL-22 e IL-22R divulgadas en las figuras adjuntas se muestran comenzando con restos de metionina denominados en el presente documento como la posición 1 de aminoácido, es concebible y posible que otros restos de metionina ubicados bien cadena arriba o cadena abajo de la posición 1 de aminoácido en las figuras pueda usarse como el resto de aminoácido de inicio para los polipéptidos de IL-22 o IL-22R.

45 Una "variante de IL-22", una "variante de IL-22R", un "polipéptido variante de IL-22" o un "polipéptido variante de IL-22R" significa un polipéptido activo de IL-22 o de IL-22R, tal como se define anteriormente, que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de una secuencia nativa de longitud completa de la secuencia polipeptídica de IL-22 o IL-22R. Comúnmente, un polipéptido variante de IL-22 o de IL-22R tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos, y como alternativa al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de una secuencia nativa de longitud completa o madura de una secuencia polipeptídica de IL-22 o IL-22R.

65 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos", con respecto a las secuencias polipeptídicas de IL-22 o de IL-22R identificadas en el presente documento, se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una

secuencia candidata que son idénticos respecto de los restos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica específica de IL-22 o de IL-22R, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin consideran cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

15 100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de restos de aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias en el alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que en los casos donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto de B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto de A. Como ejemplo de los cálculos de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando este método, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "Proteína de comparación" respecto de la secuencia de aminoácidos denominada "IL-22 o IL-22R", en las que "IL-22 o IL-22R" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-22 o de IL-22R de interés, la "Proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente al cual se está comparando el polipéptido de "IL-22 o IL-22R", y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes restos de aminoácidos.

Tabla 2

IL-22 o IL-22R	XXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

30 % de identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de restos de aminoácidos idénticos coincidentes entre las dos secuencias polipeptídicas) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de IL-22 o IL-22R) = 5 dividido entre 15 = 33,3 %

Tabla 3

IL-22 o IL-22R	XXXXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXYYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

35 % de identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de restos de aminoácidos idénticos coincidentes entre las dos secuencias polipeptídicas) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de IL-22 o IL-22R) = 5 dividido entre 10 = 50 %

40 El término "IL-19" se refiere a cualquier forma nativa de IL-19 de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca IL-19 sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de IL-19 que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de IL-19 de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, y otras isoformas. El término también abarca fragmentos o variantes de una IL-19 nativa que mantenga al menos una actividad biológica de IL-19.

45 El término "IL-20" se refiere a cualquier forma nativa de IL-20 de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca IL-20 sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de IL-20 que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de IL-20 de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, y otras isoformas. El término también abarca fragmentos o variantes de una IL-20 nativa que mantenga al menos una actividad biológica de IL-20.

55 El término "IL-24" se refiere a cualquier forma nativa de IL-24 de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca IL-24 sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de IL-24 que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de IL-24 de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, y otras isoformas. El término también abarca fragmentos o variantes de una IL-24 nativa que mantenga al menos una actividad biológica de IL-24.

- El término "IL-22BP" o la expresión "proteína de unión a IL-22", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier IL-22BP nativa de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca IL-22BP sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de IL-22BP que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de IL-22BP de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, y otras isoformas. El término también abarca fragmentos o variantes de una IL-22BP nativa que mantenga al menos una actividad biológica de IL-22BP. IL-22BP nativa también se cita como "IL-22RA2" en la técnica.
- El término IL-20Ra se refiere a un componente polipeptídico de un heterodímero de receptor de IL-19 o de un heterodímero de receptor de IL-20. El término abarca cualquier IL-20Ra nativa de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca IL-20Ra sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de IL-20Ra que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de IL-20Ra de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, y otras isoformas. El término también abarca fragmentos o variantes de una IL-20Ra nativa que mantenga al menos una actividad biológica de IL-20Ra. IL-20Ra nativa también se cita como "IL-20R1" en la técnica.
- El término IL-20Rb se refiere a un componente polipeptídico de un heterodímero de receptor de IL-19 o de un heterodímero de receptor de IL-20. El término abarca cualquier IL-20Rb nativa de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca IL-20Rb sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de IL-20Rb que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de IL-20Rb de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, y otras isoformas. El término también abarca fragmentos o variantes de una IL-20Rb nativa que mantenga al menos una actividad biológica de IL-20Rb. IL-20Rb nativa también se cita como "IL-20R2" en la técnica.
- El término "IL-10R2" se refiere a un componente polipeptídico de un heterodímero de receptor de IL-22 o de un heterodímero de receptor de IL-20. El término abarca cualquier IL-10R2 nativa de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca IL-10R2 sin procesar de "longitud completa" así como cualquier forma de IL-10R2 que sea el resultado de procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de IL-10R2 de origen natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, y otras isoformas. El término también abarca fragmentos o variantes de una IL-10R2 nativa que mantenga al menos una actividad biológica de IL-10R2. IL-10R2 nativa también se cita como "IL-10Rb" en la técnica.
- Una molécula biológica "aislada", tal como los diversos polipéptidos, polinucleótidos, y anticuerpos divulgados en el presente documento, se refiere a cualquier molécula biológica que se haya identificado y separado y/o recuperado a partir de al menos un componente de su ambiente natural.
- "Activa" o "actividad", en referencia a IL-22 o IL-22R, se refiere a una actividad biológica y/o inmunológica de una IL-22 o IL-22R nativa, donde actividad "biológica" se refiere a una función biológica de una IL-22 o IL-22R nativa distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico procesado por la IL-22 o IL-22R nativa. Una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por una IL-22 o IL-22R nativa.
- El término "antagonista" se usa en su sentido más amplio, e incluye a cualquier molécula que bloquee, inhiba, o neutralice parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido, tal como un polipéptido de IL-22 o IL-22R nativo. También se encuentran abarcadas por "antagonista" las moléculas que inhiben completa o parcialmente la transcripción o traducción del ARNm que codifica al polipéptido. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos antagonistas; fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido nativo; péptidos; oligonucleótidos antisentido; moléculas orgánicas pequeñas; y ácidos nucleicos que codifican antagonistas polipeptídicos o anticuerpos antagonistas. La referencia a "un" antagonista abarca un solo antagonista o una combinación de dos o más antagonistas diferentes.
- El término "agonista" se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido, tal como un polipéptido de IL-22 o IL-22R nativo. También se encuentran abarcadas por "agonista" las moléculas que estimulan la transcripción o traducción del ARNm que codifica al polipéptido. Las moléculas agonistas adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo agonistas; un polipéptido nativo; fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido nativo; péptidos; oligonucleótidos antisentido; moléculas orgánicas pequeñas; y ácidos nucleicos que codifican polipéptidos o anticuerpos agonistas. La referencia a "un" agonista abarca un solo agonista o una combinación de dos o más agonistas diferentes.
- "Alivio" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a profiláctico o medidas preventivas, donde el objetivo es prevenir o frenar (atenuar) la afección o trastorno patológico diana. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen

aquellos que ya padecen el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se quiera prevenir el trastorno.

5 La administración "crónica" se refiere a la administración de un agente (o agentes) de una manera continua, a diferencia de un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se efectúa consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

10 Un "mamífero", para los fines del tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, roedores (por ejemplo, ratones y ratas), y monos; animales domésticos y de granja; y animales de zoológico, de deporte, de laboratorio o de compañía, tales como perros, gatos, ganado bovino, caballos, oveja, cerdos, cabras, conejos, etc. En algunas realizaciones, el animal se selecciona entre un ser humano, roedor, o mono.

15 La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

20 Los "vehículos", tal como se usa en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

30 Los "anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen características estructurales similares. Aunque los anticuerpos muestran especificidad de unión para un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que generalmente carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo, por ejemplo, se producen a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles aumentados por mielomas.

35 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de manera intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpo (tal como se describe en más detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

40 Un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno particular se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno con suficiente afinidad de tal forma que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a un antígeno. Preferentemente, el alcance de la unión de dicho anticuerpo a un polipéptido no diana es menor de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo al antígeno diana según se mide, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a un antígeno diana tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, o $\leq 0.1 \text{ nM}$.

50 La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede citarse como "VH". El dominio variable de la cadena ligera puede citarse como "VL". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

55 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones del dominio variable difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más elevadamente conservadas de dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de beta-lámina. Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestra varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

5 Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas clases se puede subdividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen de manera general en, por ejemplo, Abbas et al. Cellular and Mol, Immunology, 4^a ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo con otras una o más proteínas o péptidos.

15 Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no como fragmentos de anticuerpo tal como se definen más adelante. Las expresiones se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

20 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden únicamente una porción de un anticuerpo intacto, en los que la porción retiene al menos una y tantas como sea posible o todas las funciones asociadas normalmente con esa porción cuando están presentes en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y por lo tanto mantiene la capacidad para unirse a un antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, mantiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de ADCC y unión a complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

30 La digestión de papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y es todavía capaz de reticular antígeno.

35 "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie de dos cadenas Fv consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente mediante un enlazante peptídico flexible de tal modo que las cadenas ligeras y pesadas pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. De manera colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

50 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto (o los restos de cisteína) de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos.

55 Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de scFv comprende además un enlazante polipeptídico entre los dominios VH y VL que permiten al scFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los scFv véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

60 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser divalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, el

documento EP 404.097; el documento WO 93/1161, Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; y en Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., (2003) Nat. Med. 9:129-134.

5 La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto en posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica la característica de que el anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo
10 monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a antígeno se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia de polipéptido de unión a diana de diversas secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de diversos clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada
15 puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo
20 monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante o antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en tanto que normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe entenderse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Köhler et al., Nature, 256: 495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)),
30 métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen la totalidad o partes de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); las Patentes de los Estados Unidos con números 5.545.807, 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; Marks et al., Bio. Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos
45 derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

50 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima parte de la secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que se reemplazan los restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o un primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad
55 deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden efectuarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y las referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, Ann.

Allergy. *Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998). Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

5 Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con aquella de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se divulgan en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

10 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas clases se puede subdividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2.

15 Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante reordenamiento de los dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de restos de HVR y/o marco conservados se describe por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

20 Un anticuerpo "bloqueante", anticuerpo "neutralizante", o anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. Dichos anticuerpos pueden inhibir sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

25 Un anticuerpo "agonista", tal como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido de interés.

30 Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

35 La "afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar en general por su constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen lentamente al antígeno y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen generalmente al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención. Las realizaciones ilustrativas específicas se describen a continuación.

40 En una realización, la "Kd" o el "valor de Kd" se mide mediante un ensayo de unión con antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab por su antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ¹²⁵I en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, y a continuación capturar el antígeno unido con una placa revestida de anticuerpo contra Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881). Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren durante toda una noche placas de microtitulación (Dynex) con 5 mg/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6), y posteriormente se bloqueó con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc Nº 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de [¹²⁵I]-antígeno con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). El Fab de interés se incubaba entonces durante toda una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurarse de que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando se secan las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleante (MicroScint-20; Packard), y las placas se contaron en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan una unión menor o igual al 20 % de la máxima se seleccionan para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, se mide la K_d o el valor de K_d usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un instrumento Biacore™-2000 o Biacore™-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con antígeno inmovilizado en microplacas CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, Biacore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 mg/ml (~0.2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las medidas cinéticas se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo simple de unión Langmuir uno a uno (programa de evaluación Biacore® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la velocidad de asociación sobrepasa los $10^6 M^{-1} s^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, puede determinarse la velocidad de asociación usando una técnica de inactivación fluorescente que mida el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con retención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "velocidad de asociación" o " k_{on} " de acuerdo con la presente invención también puede determinarse tal como se describe anteriormente usando un sistema Biacore™-2000 o Biacore™-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ).

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que pueden interferir con usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más de del 95 % en peso de anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry, y más preferentemente a más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácido N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, porque al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo, un anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente a una molécula (tal como un ácido nucleico, polipéptido, o anticuerpo) para generar una molécula "marcada". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato, dando como resultado un producto detectable.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que puede adherirse una molécula (tal como un ácido nucleico, polipéptido, o anticuerpo). Los ejemplos de fases sólidas abarcadas por el presente documento incluyen aquellas formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En determinadas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como aquellas descritas en la Patente de los Estados Unidos N° 4.275.149.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco (tal como un ácido nucleico, polipéptido, anticuerpo, agonista o antagonista) a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuestos comúnmente en formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

Una "molécula pequeña" o molécula orgánica pequeña se define en el presente documento como una molécula orgánica que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

Un "oligopéptido" que se une a un polipéptido mayor es un oligopéptido que es capaz de unirse al polipéptido diana con una afinidad suficiente de tal forma que el oligopéptido es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse al polipéptido. En determinadas realizaciones, el alcance de la unión de un oligopéptido a un polipéptido no diana no relacionado es menos de aproximadamente el 10 % de la unión del oligopéptido al polipéptido diana según se mide, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En determinadas realizaciones, un oligopéptido se une a un polipéptido diana con una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, o $\leq 0.1 \text{ nM}$.

- Una "molécula orgánica" que se une a un polipéptido diana es una molécula orgánica distinta de un oligopéptido o de un anticuerpo tal como se define en el presente documento que es capaz de unirse a un polipéptido diana con suficiente afinidad de tal forma que la molécula orgánica es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse al polipéptido. En determinadas realizaciones, el alcance de la unión de una molécula orgánica a un polipéptido no diana no relacionado es de menos de aproximadamente el 10 % de la unión de la molécula orgánica al polipéptido diana según se mide, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En determinadas realizaciones, una molécula orgánica se une a un polipéptido diana con una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, o $\leq 0.1 \text{ nM}$.
- 5
- 10 Un "sistema biológico" es un sistema *in vitro*, *ex vivo* o *in vitro* que comprende células de mamífero que comparten una ruta de señalización común.
- La expresión "enfermedad relacionada con la inmunidad" significa una enfermedad en la que un componente del sistema inmunitario de un mamífero causa, media o de otro modo contribuye a una morbilidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en las que la estimulación o intervención del sistema inmunitario tiene un efecto de mejora en la progresión de la enfermedad. Dentro de este concepto se incluyen enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune, enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmune, enfermedades infecciosas, enfermedades por inmunodeficiencia, y neoplasias.
- 15
- 20 La expresión "enfermedad mediada por células T" significa una enfermedad en la que las células T median directa o indirectamente o de otro modo contribuyen a una morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por células T puede estar asociada con efectos mediados por células, efectos mediados por linfocinas, etc., e incluso efectos asociados con células B si se estimulan las células B, por ejemplo, mediante las linfocinas secretadas por células T.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término "psoriasis" se define como una afección caracterizada por la erupción de macropápulas discretas y confluentes, enrojecidas, con escamación plateada circunscritas principalmente a los codos, rodillas, cuero cabelludo o tronco.
- El término "tumor", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un crecimiento y proliferación celular neoplásica, ya sea maligna o benigna, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes, tal como se cita en el presente documento.
- 30
- La expresión "progresión tumoral" se refiere al crecimiento y/o proliferación de un tumor.
- 35
- Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento/proliferación celular no regulados. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin), blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más particulares de este tipo de cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma pulmonar epidermoide, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer gástrico, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.
- 40
- 45
- Un "trastorno autoinmunitario" o la "autoinmunidad" se refieren a cualquier afección en la que se despliega una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células contra un tejido propio del organismo. Un "trastorno autoinmunitario mediado por IL-23" es cualquier trastorno autoinmunitario que esté causado, mantenido o exacerbado por la actividad de IL-23.
- 50
- La "inflamación" se refiere a la acumulación de leucocitos y a la dilatación de vasos sanguíneos en un sitio de lesión o de infección, que normalmente causa dolor, inflamación, y enrojecimiento.
- 55
- La "inflamación crónica" se refiere a la inflamación en la que la causa de la inflamación persiste y es difícil o imposible de eliminar.
- La "inflamación autoinmunitaria" se refiere a la inflamación asociada con un trastorno autoinmunitario.
- 60
- La "inflamación artrítica" se refiere a la inflamación asociada con la artritis.
- La "enfermedad inflamatoria del intestino" o "EII" se refiere a un trastorno crónico caracterizado por la inflamación del tracto gastrointestinal. La EII abarca colitis ulcerosa, que afecta al intestino grueso y/o al recto, y la enfermedad de Crohn, que puede afectar al sistema gastrointestinal completo, pero que afecta más frecuentemente al intestino delgado (íleo) y posiblemente al intestino grueso.
- 65

La "artritis" se refiere a la inflamación de las articulaciones, e incluye, pero sin limitación, artrosis, gota, artritis asociada con infecciones, artritis del síndrome de Reiter, y artritis asociada con trastornos autoinmunitarios, tales como artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis asociada a lupus, espondilitis anquilosante, y artritis asociada con esclerodermia.

5 La expresión "cantidad eficaz" es una concentración o cantidad de una molécula (por ejemplo, un ácido nucleico, polipéptido, agonista, o antagonista) que da como resultado la consecución de un fin concreto indicado. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una concentración o cantidad de una molécula que es eficaz para lograr un efecto terapéutico indicado. Esta cantidad también puede determinarse empíricamente.

10 La expresión "agente citotóxico" cuando se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngicos, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

15 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinosido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y docetaxel (Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la Patente de los Estados Unidos Nº 4.675.187), melfalano y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como tamoxifeno y onapristona.

25 Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que sobreexpresa cualquiera de los genes identificados en el presente documento, bien *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, un agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce de manera significativa el porcentaje de células que expresan dichos genes en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un sitio distinto de fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen vincas (vincristina y vinblastina), taxol, e inhibidores de topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también se extienden a la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente en la pág. 13.

40 El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan en otra población de células como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son las linfocinas, monocinas, y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona del crecimiento, tal como la hormona del crecimiento humana, N-metionil-hormona del crecimiento humana, y la hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina, relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteínicas, tales como hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de crecimiento tumoral- α y - β ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como EGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento insulínico-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , - β , y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activo de las secuencias nativas de citocinas.

60 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células inflamatorias" indica células que potencian la respuesta inflamatoria, tales como células mononucleares, eosinófilos, macrófagos, y neutrófilos polimorfonucleares (PMN).

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE LA INVENCIÓN

A. Polinucleótidos y polipéptidos de IL-22 o IL-22R

65 En el presente documento se describen polipéptidos de IL-22 o IL-22R aislados y secuencias nucleotídicas aisladas

que codifican estos polipéptidos. Los polipéptidos de IL-22 o IL-22R abarcan polipéptidos de IL-22 o IL-22R de longitud completa o maduros así como variantes de IL-22 o IL-22R. Las variantes de IL-22 o IL-22R pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en el ADN para IL-22 o IL-22R, y/o mediante síntesis del polipéptido de IL-22 o IL-22R deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar el procesamiento postraduccional del IL-22 o IL-22R, tal como cambiando el número o posición de los sitios de glucosilación o alterando las características de anclaje a membrana.

Las variaciones en IL-22 o IL-22R nativa o en varios dominios de IL-22 o IL-22R, tal como se describe en el presente documento, pueden efectuarse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y orientaciones para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, eliminación o inserción de uno o más codones que codifican a la IL-22 o IL-22R que dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de la IL-22 o IL-22R en comparación con una IL-22 o IL-22R de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante la sustitución de al menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más dominios de la IL-22 o IL-22R. Puede encontrarse una orientación para determinar qué resto de aminoácido puede insertarse, sustituirse o eliminarse sin afectar de manera negativa a la actividad deseada comparando la secuencia de la IL-22 o IL-22R con la de moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencia de aminoácidos efectuados en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones o eliminaciones pueden encontrarse opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse efectuando inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de manera sistemática en la secuencia y ensayando las variantes resultantes respecto de su actividad mostrada por la secuencia de longitud completa o nativa madura.

En la Tabla 6 se muestran sustituciones conservativas de interés bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 6, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a clases de aminoácidos, y se exploran los productos.

Tabla 6

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

Se logran modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del polipéptido de IL-22 o IL-22R seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura del armazón polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

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

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o más preferentemente, en el resto de sitios (no conservados).

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

También se proporcionan en el presente documento fragmentos polipeptídicos de IL-22 o IL-22R. Dichos fragmentos pueden truncarse en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud completa. Determinados fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido de IL-22 o IL-22R. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, un fragmento de IL-22 o IL-22R es biológicamente activo. En determinadas realizaciones, un fragmento de IL-22 de longitud completa carece de la secuencia de péptido de señal N-terminal. En determinadas realizaciones, un fragmento de IL-22R es una forma soluble de IL-22R que no está unida a membrana, por ejemplo, una forma de IL-22R que carece de un dominio transmembrana. Por ejemplo, una forma soluble de IL-22R humana puede carecer de la totalidad o de una parte sustancial del dominio transmembrana desde los aminoácidos 229-251 de SEC ID N°: 3.

Se incluyen dentro del alcance de la invención modificaciones covalentes de IL-22 o IL-22R. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácido diana de un polipéptido de IL-22 o IL-22R con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas de los restos N-o C-terminales del IL-22 o IL-22R. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular IL-22 o IL-22R a una matriz de soporte o superficie insoluble en agua para su uso en el método para purificar anticuerpos anti-IL-22 o IL-22R, y viceversa. Los agentes reticulantes usados de manera común incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de succinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

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

Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido de IL-22 o IL-22R incluida dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glucosilación nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glucosilación nativo" se entiende para los fines en el presente documento eliminar uno o más restos de carbohidrato encontrados en IL-22 o IL-22R de secuencia nativa (bien eliminando el sitio de glucosilación subyacente o eliminando la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en IL-22 o IL-22R de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos restos de carbohidratos presentes.

Un polipéptido de IL-22 o IL-22R de la presente invención también puede modificarse de un modo para formar una molécula quimérica que comprende IL-22 o IL-22R fusionada a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En una realización, una molécula quimérica comprende una fusión del IL-22 o IL-22R con un polipéptido marcador que comprende un epitopo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-marcador. El marcador epitópico se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo del IL-22 o IL-22R. La presencia de dichas formas marcadas epitópicamente del IL-22 o IL-22R puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Asimismo, proporcionar el marcador epitópico permite que se purifique fácilmente el IL-22 o IL-22R mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se una al marcador epitópico. Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos marcadores y sus anticuerpos respectivos. Los ejemplos incluyen marcadores de poli-histidina (poli-his) o de poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para este [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616

(1985)]; y el marcador de glucoproteína D (gD) del virus *Herpes simplex* y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido del epítipo KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido del epítipo de alfa-tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem. 266:15163-15166 (1991)]; y el marcador peptídico de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

Una molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido de IL-22 o IL-22R con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también citada como una "inmuno adhesina"), dicha fusión puede ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble de un polipéptido de IL-22 o IL-22R en lugar de al menos una región variable con una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG 1. Para la producción de fusiones a inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.428.130 publicada el 27 de junio de 1995.

1. Preparación de IL-22 o IL-22R

IL-22 o IL-22R pueden prepararse mediante métodos recombinantes rutinarios, por ejemplo, cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica una IL-22 o IL-22R, tal como se ejemplifica por el ácido nucleico mostrado en la Figura 1, que codifica una IL-22. También se proporcionan células hospedadoras que comprenden dicho vector. A modo de ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, *E. coli*, o levaduras. Además se proporciona un proceso para producir cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento y comprende cultivar células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

Se describen moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionados a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heteróloga. Los ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionados a una secuencia marcadora epitópica o a una región Fc de una inmunoglobulina.

Por supuesto, se contempla que puedan usarse métodos alternativos bien conocidos en la técnica para preparar IL-22 o IL-22R. Por ejemplo, la secuencia de IL-22 o IL-22R, o porciones de la misma, puede producirse mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* puede efectuarse usando técnicas manuales o mediante automatización. Puede lograrse la síntesis automatizada, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse químicamente por separado diversas porciones del IL-22 o IL-22R y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir el IL-22 o IL-22R de longitud completa.

El IL-22 o IL-22R expresado de manera recombinante puede recuperarse del medio de cultivo o a partir de lisados de células hospedadoras. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación por etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatofluore; SDS-PAGE; precipitación por sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A seferosa para eliminar contaminantes, tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unirse a formas marcadas epitópicamente del IL-22 o IL-22R. Pueden emplearse diversos métodos de purificación y se conocen dichos métodos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutseber, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa seleccionada (o las etapas) dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y de la IL-22 o IL-22R particular producida.

2. Detección de la expresión génica

La expresión de un gen que codifica IL-22 o IL-22R puede detectarse mediante diversos métodos de la técnica, por ejemplo, detectando la expresión de ARNm que codifica a IL-22 o IL-22R. Tal como se usa en el presente documento, el término "detectar" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Al detectar la expresión de IL-22 o IL-22R, se pueden identificar, por ejemplo, aquellos tejidos que expresan un gen de IL-22 o IL-22R. La expresión génica puede medirse usando determinados métodos conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, transferencia de Northern, (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]); PCR cuantitativa; o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada de manera adecuada, basada en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, la expresión génica puede medirse mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejidos y ensayo del cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de muestras de fluidos abarcan cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. De manera conveniente, los anticuerpos pueden prepararse contra una secuencia nativa de un polipéptido de IL-22 o IL-22R; contra un péptido sintético que comprende un fragmento de una secuencia polipeptídica de IL-22 o IL-22R; o contra una secuencia exógena fusionada a un polipéptido de IL-22 o IL-22R o fragmento del mismo (incluyendo un péptido

sintético).

B. Anticuerpos

5 Se proporcionan anticuerpos que se unen a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o a continuación, por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido de IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-20Ra, IL-20Rb, IL-10R2, o de IL-22R. Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, humanos, biespecíficos, y heteroconjugados. Un anticuerpo puede ser una fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')₂. En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a un IL-22 o IL-22R. En una de dichas realizaciones, un anticuerpo bloquea parcial o completamente la actividad de un polipéptido de IL-22 o IL-22R (es decir, un anticuerpo "bloqueante").

15 Se proporcionan en el presente documento anticuerpos monoclonales ejemplares que se unen a IL-22 e IL-22R y se describen adicionalmente en los Ejemplos. Estos anticuerpos incluyen los anticuerpos anti-IL-22 denominados 3F11.3 ("3F11"), 11H4.4 ("11H4"), y 8E11.9 ("8E11"), y los anticuerpos anti-IL-22R denominados 7E9.10.8 ("7E9"), 8A12.32 ("8A12"), 8H11.32.28 ("8H11"), e 12H5. Se proporciona un hibridoma que produce cualquiera de estos anticuerpos. Se proporcionan anticuerpos monoclonales que compiten con 3F11.3, 11H4.4, u 8E11.9 por la unión a IL-22. Se proporcionan anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo que 3F11.3, 11H4.4, u 8E11.9. Se proporcionan anticuerpos monoclonales que compiten con 7E9, 8A12, 8H11, o 12H5 por la unión a IL-22R. Se proporcionan anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo que 7E9, 8A12, 8H11, o 12H5. A continuación se proporcionan varias realizaciones de anticuerpos:

1. Anticuerpos policlonales

25 Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Pueden provocarse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectará al mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir al polipéptido de interés o a una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante de MPL-TDM (monofosforilo Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por un experto en la materia sin experimentación innecesaria.

2. Anticuerpos monoclonales

40 Los anticuerpos pueden ser, como alternativa, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal hospedador adecuado se inmuniza normalmente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

45 El agente inmunizante incluirá normalmente al polipéptido de interés o a una proteína de fusión del mismo. En general, se usan bien linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o de nódulo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Entonces se fusionan los linfocitos con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Generalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células no fusionadas inmortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), evitando estas sustancias el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

60 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionen eficazmente, que soporten niveles de expresión elevados de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y que sean sensibles a un medio, tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son líneas de mieloma murino que pueden obtenerse, por ejemplo, a través del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas de mieloma humano y de heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63].

65 Entonces puede ensayarse el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma respecto de la presencia

de anticuerpos monoclonales que se unen al polipéptido de interés. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecerse mediante métodos convencionales [Goding, anteriormente citado]. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales usando bibliotecas combinatorias para explorar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica varios métodos para generar bibliotecas de presentación de fagos y para explorar dichas bibliotecas en busca de anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos se describen de manera general en Hoogenboom et al., (2001) en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en determinadas realizaciones, en Lee et al. (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093.

En principio, los clones sintéticos de anticuerpos se seleccionan explorando fagotecas que contienen fagos que muestran varios fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionadas a una proteína de envuelta del fago. Dichas fagotecas se panean mediante cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos de Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y se separan de este modo de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones que se unen se eluyen entonces del antígeno, y pueden enriquecerse adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. cualquiera de los anticuerpos de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de cribado de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y las secuencias adecuadas de la región constante (Fc) descritas en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), Volúmenes 1-3.

Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante, tales como aquellas descritas en la Patente de los Estados Unidos Nº 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfecta en células hospedadoras, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. También puede modificarse el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas [Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; Morrison et al., anteriormente citado] o uniendo covalentemente la secuencia codificante de inmunoglobulina a la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

3. Anticuerpos monovalentes

También se proporcionan anticuerpos monovalentes. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier posición en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Como alternativa, se sustituyen los restos de cisteína relevantes con otro resto de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

También son adecuados los métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular, fragmentos Fab, puede llevarse a cabo usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

4. Fragmentos de anticuerpo

También se proporcionan fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse mediante medios convencionales, tales como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En determinados casos hay ventajas en cuanto al uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para una
5 revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al., (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, hoy en día esos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las fagotecas de anticuerpos discutidas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos de F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* aumentada que comprenden restos de epítipo de unión a receptor salvajes se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 5.869.046. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos para el experto en la materia. En determinadas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las Patentes de Estados Unidos Nº 5.571.894; y 5.587.458. Los Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están libres de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuadas para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino terminal o carboxilo terminal de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, anteriormente citado. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.
10
15
20
25

5. Anticuerpos humanizados

También se proporcionan anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "donante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.
30
35
40

La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la producción de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se reconoce frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que sea más próxima a la del roedor se acepta como el marco conservado humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo marco conservado para diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623).
45
50

Además es generalmente deseable que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles de manera común y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos). En general, los restos de la región hipervariable están directa y muy sustancialmente involucrados en influenciar la unión al antígeno.
55
60
65

6. Anticuerpos humanos

También se proporcionan anticuerpos humanos. Puede construirse anticuerpos humanos combinando clones de secuencias de dominio variable de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fago derivadas de ser humano con secuencias de dominio constante conocidas tal como se describe anteriormente. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de la invención mediante el método de hibridoma. Se han descrito las líneas celulares del mieloma humano y del heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También puede usarse el reordenamiento génico para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo de partida no humano. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta epitópica", se reemplazan bien la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano mediante técnicas de presentación en fago tal como se describen en el presente documento con un repertorio de genes de dominio V humano, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tal la retirada de la cadena no humana correspondiente en el con de presentación en fago primario, es decir, el epítipo rige (deja su impronta) en la selección del compañero de cadena humana. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la tradicional humanización de anticuerpos no humanos injertando las CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o de CDR de origen no humano.

7. Anticuerpos biespecíficos

También se proporcionan anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es para un polipéptido de interés y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de un polipéptido de interés. Los anticuerpos biespecíficos se pueden utilizar también para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un polipéptido de interés, tal como un polipéptido de la superficie celular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAT226 y un brazo que se une a un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloides de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o un hapteno de isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab)₂).

Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la distribución al azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) reproducen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se efectúa normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es laboriosa, y el rendimiento de producto es bajo. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan para secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En determinadas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan de manera conjunta en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres

fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico al de la cadena (o cadenas) lateral reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documento WO 91/00360, documento WO 92/00373, y documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en la materia agentes reticulantes adecuados, y se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980, junto con un número de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica F(ab')₂ totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de HER2 y a linfocitos T humanos normales, así como de provocar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" se describe por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por medio de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza a que los dominios VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha comunicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros monocatenarios de Fv (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

8. Anticuerpos multivalentes

5 También se proporcionan anticuerpos multivalentes. Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos a los de clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse
10 fácilmente mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno en posición amino-terminal respecto de la región Fc. En determinadas realizaciones, un anticuerpo multivalente
15 comprende (o consiste en) de tres a ocho sitios de unión a antígeno. En una de dichas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en el que las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, las cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazante flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente
20 ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

9. Anticuerpos de un solo dominio

30 También se proporcionan anticuerpos de un solo dominio. Un anticuerpo de un solo dominio es una sola cadena polipeptídica que comprende la totalidad o parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de un solo dominio consiste en la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

10. Variantes de anticuerpos

40 En algunos casos, se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios adecuados en la secuencia nucleotídica que codifica al anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en la secuencia
45 de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción, y sustitución se puede realizar para conseguir la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Pueden introducirse las modificaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se produce la secuencia.

50 Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina", tal como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En el presente documento se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de anticuerpos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales o distintas en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque esté predeterminado el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí esté determinada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo barrido de ala o mutagénesis al azar en el codón o región diana y se explora la actividad deseada para las
60 inmunoglobulinas expresadas.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminal en el intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos simples o múltiples de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, ADEPT) o con un polipéptido que aumente la semivida en suero del

anticuerpo.

En determinados casos, se altera un anticuerpo para aumentar o disminuir la medida en la que el anticuerpo está glucosilado. La glucosilación de polipéptidos es generalmente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión de un resto de carbohidrato en la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o eliminación de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que se crea o elimina una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente descritas (por ejemplo, sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también puede producirse mediante la alteración, eliminación o sustitución de uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos a O).

En los casos donde el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se citan anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante en el carbohidrato unida a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y en la Patente de los Estados Unidos N° 6.602.684, Umana et al. Se comunican anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 1997/30087, Patel et al. Véanse, también el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) referente a anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana et al.) referente a moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

En determinadas realizaciones, una variante de glucosilación comprende una región Fc, en la que una estructura de carbohidrato unida a la región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen función de ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en esta que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de los restos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: los documentos 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; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares *knockout*, tales como células CHO *knockout* para el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. En la Tabla 6 anterior se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio deseable en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 6, o tal como se describe adicionalmente en referencia a clases de aminoácidos, y pueden explorarse los anticuerpos resultantes respecto de las propiedades de unión deseadas.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) en relación al anticuerpo parental a partir del que se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se muestran a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones con al menos parte de una proteína de envuelta de fago (por ejemplo, el producto génico III de M13) empaquetado con cada partícula. Entonces se explora la actividad biológica de las variantes presentadas en fagos (por ejemplo, la afinidad de unión). Para identificar sitios de región hipervariables candidatos para modificación, puede efectuarse mutación de barrido (por ejemplo, de barrido de alanina) para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de

contacto y restos vecinos son candidatos a sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia, incluyendo aquellas explicadas en el presente documento. Una vez se han generado dichas variantes, se somete el panel de variantes a cribado usando técnicas conocidas en la materia, incluyendo aquellas divulgadas en el presente documento, y pueden seleccionarse los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo posterior.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitios), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos de la invención, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo aquellas de una cisteína de bisagra.

De acuerdo con esta descripción y con las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas situaciones, un anticuerpo pueda comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo, en la región Fc. Estos anticuerpos pueden, sin embargo, mantener sustancialmente las mismas características necesarias para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que pueden efectuarse determinadas alteraciones en la región Fc que darán como resultado unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) alteradas (es decir, aumentadas o disminuidas), por ejemplo, tal como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter, Nature 322:738-40 (1988); la patente de Estados Unidos N° 5.648.260; la patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y el documento WO 94/29351 que se refieren a otros ejemplos de variantes en la región Fc. El documento WO00/42072 (Presta) y el documento WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. El contenido de estas publicaciones de patente se incorpora específicamente al presente documento por referencia. Véase, también Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que son responsables de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer et al, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se han descrito en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.194.551 B1, documento WO99/51642. El contenido de estas publicaciones de patente se incorpora específicamente al presente documento por referencia. Véase, también Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

En un aspecto, los anticuerpos pueden comprender modificaciones en la interfaz de polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en la que la protuberancia se puede posicionar en la cavidad para promover la formación de complejos entre el primer y el segundo polipéptido de Fc. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la materia, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.731.168.

11. Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos pueden modificarse adicionalmente para que contengan restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden tener las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, de si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de anticuerpo y restos no proteínicos que se pueden haber calentado selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye,

pero sin limitación, longitudes de onda que no dañen a células normales, pero que calientan al resto no proteínico hasta una temperatura a la que se eliminan las células próximas al anticuerpo-resto no proteínico.

5 En determinadas realizaciones, puede marcarse y/o puede inmovilizarse un anticuerpo sobre un soporte sólido. En un aspecto adicional, un anticuerpo es un anticuerpo anti-idiotípico.

12. Anticuerpos heteroconjugados

10 También se proporcionan anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos N° 4.676.980], y para el tratamiento de infección por VIH [documentos WO 91/00360, WO 92/200373, EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotioato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos divulgados, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 4.676.980.

13. Anticuerpos citotóxicos

20 También se proporcionan anticuerpos citotóxicos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo citotóxico es un anticuerpo anti-IL-22, tal como aquellos que se proporcionan más adelante, que lleva a cabo una función efectora y/o induce la muerte celular. En determinadas realizaciones, un anticuerpo citotóxico anti-IL-22R se une al dominio extracelular de un IL-22R.

25 14. Modificación de la función efectora por ingeniería genética

Puede ser deseable modificar un anticuerpo respecto a su función efectora para potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo para tratar una enfermedad, tal como un cáncer. Por ejemplo, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral potenciada también pueden prepararse usando reticulantes heterobifuncionales tal como se describen en Wolff et al. Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede modificarse por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede de este modo potenciarse la lisis de complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

15. Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

40 Para la producción recombinante de un anticuerpo, en una realización, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica al anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La selección del vector depende, en parte, de la célula hospedadora que se va a usar. En general, las células hospedadoras son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse a partir de cualquier especie humana o animal.

50 a) Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariotas:

(1) Construcción del vector

55 Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos de un anticuerpo usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias polinucleotídicas deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Como alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, se insertan las secuencias que codifican los polipéptidos en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Pueden usarse muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica para los fines de la presente invención. La selección de un vector adecuado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que van a insertarse en el vector y de la célula hospedadora concreta que va a transformarse con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo, o ambas) y de su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosomas (RBS), una secuencia de señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, pueden usarse vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora en conexión con estos hospedadores. El vector porta generalmente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y a tetraciclina (Tet) y por lo tanto proporciona un medio fácil para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos o bacteriófagos microbianos pueden contener también, o modificarse para que contengan, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter et al., Patente de Estados Unidos N° 3.648.237.

Además, pueden usarse vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que sean compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en conexión con estos hospedadores. Por ejemplo, puede usarse un bacteriófago, tal como λ GEM.TM.-11 para producir un vector recombinante que pueda usarse para transformar a células hospedadoras susceptibles, tales como *E. coli* LE392.

Un vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas se encuentran normalmente dentro de dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente a ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor del ADN de origen mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Pueden usarse tanto secuencias promotoras nativas como muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y rendimientos superiores de gen diana expresado en comparación con el promotor del polipéptido diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotor de β -galactamasa y de lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Se han publicado sus secuencias nucleotídicas, permitiendo de este modo que un trabajador experto los ligue de manera operativa a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) usando enlazantes o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción necesario.

En un aspecto de la invención, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de secuencia de señal de secreción que dirige la traslocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada para los fines de esta invención debe ser una que se reconozca y procese (es decir, se escinda por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. Para células procariotas que no reconocen y procesan las secuencias de señal nativas para polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal de procariotas seleccionada, por ejemplo, entre el grupo que consiste en líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, *lpp*, o enterotoxina estable al calor II (STII), *LamB*, *PhoE*, *PeIB*, *OmpA* y *MBP*. En una realización de la invención, las secuencias de señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal de STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere de la presencia de secuencias de señal de secreción en cada cistrón. A este respecto, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Determinadas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas *trxB* de *E. coli*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo un plegamiento y ensamblaje correcto de las subunidades de proteína expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse mediante el uso de un sistema de expresión en el que la proporción cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar el rendimiento de anticuerpos de la invención secretados y plegados de manera adecuada. Dicha modulación se logra al menos en parte mediante la modulación simultánea de fuerzas traduccionales para los componentes polipeptídicos.

Una técnica para modular la fuerza traduccional se divulga en Simmons et al., patente de Estados Unidos N° 5.840.523. Esta utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) en un cistrón. Para una TIR dada, puede crearse una serie de variantes de secuencia de aminoácido o de ácido nucleico con un intervalo de fuerzas

traduccionales, proporcionando de este modo un medio adecuado mediante el cual ajustar este factor al nivel de expresión de la cadena específica. Pueden generarse variantes de TIR mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan como resultado cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos. En determinadas realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silentes. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o en el espaciado de secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de señal. Un método para generar secuencias de señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señal (es decir, los cambios son silentes). Esto puede lograrse cambiando la tercera posición de nucleótido de cada codón; además, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina, y arginina, tienen múltiples posiciones primera y segunda que pueden añadir complejidad a la elaboración del banco. Este método de mutagénesis se describe detalladamente en Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

En una realización, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón en los mismos. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena así como la producción de los productos de anticuerpo deseados en varias combinaciones de fuerza de TIR. Las fuerzas de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador, tal como se describe de manera detallada en Simmons et al. patente de Estados Unidos N° 5.840.523. Basándose en la comparación de la fuerza traduccionales, se seleccionan las TIR individuales para que se combinen en las construcciones de vector de expresión de la invención.

Las células hospedadoras procariontas adecuadas para la expresión de anticuerpos de la invención incluyen arqueobacterias y eubacterias, tales como organismos Gram-negativos y Gram-positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. En una realización, se usan células Gram-negativas. En una realización, se usan células de *E. coli* como hospedadores para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; N° de Depósito de la ATCC 27.325) y derivados de las mismas, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ fhu Δ (Δ ton Δ) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de Estados Unidos N° 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar la bacteria adecuada teniendo en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse especies de *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* de manera adecuada como hospedadores cuando se usan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 para suministrar el replicón. Típicamente, la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse de manera deseable inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

(2) Producción de anticuerpos

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea necesario para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el hospedador procarionta de tal forma que el ADN es replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante un integrador cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se efectúa usando técnicas convencionales adecuadas para dichas células. Generalmente se usa el tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es la electroporación.

Las células procariontas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más los suplementos de nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, seleccionado basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir de manera selectiva el crecimiento de células procariontas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan el gen de resistencia a ampicilina.

También puede incluirse cualquier suplemento necesario más allá de fuentes de carbono, nitrógeno y de fosfato inorgánico a concentraciones adecuadas introducidas solas o como una mezcla con otro suplemento o medio, tal como una fuente compleja de nitrógeno. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados entre el grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditiotreititol y ditiotreititol.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. En determinadas realizaciones, para el crecimiento de *E. coli*, las temperaturas de crecimiento varían desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 39°C; desde aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 37°C; o aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH en el intervalo de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. En determinadas realizaciones, para *E. coli*, el pH es desde aproximadamente 6,8 hasta aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. En determinadas realizaciones, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Pueden usarse otros diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas implica normalmente romper al microorganismo, generalmente mediante medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, pueden eliminarse los restos celulares o células completas mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse en el medio de cultivo y aislarse a partir del mismo. Pueden eliminarse las células del cultivo y filtrarse y concentrarse el sobrenadante de cultivo para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos conocidos comunes, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se lleva a cabo en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Hay disponibles varios procedimientos de fermentación a gran escala mediante lote alimentado para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, y en determinadas realizaciones, de aproximadamente 1.000 litros a aproximadamente 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan hélices agitadoras para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferida de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador tiene una capacidad volumétrica de no más de aproximadamente 100 litros, y puede variar desde aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, se inicia la inducción de la expresión de proteínas después de que las células hayan crecido en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, en cuyo estado las células se encuentran en fase casi estacionaria. Puede usarse diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, tal como se conoce en la técnica y como se describe anteriormente. Las células pueden crecer durante periodos más cortos antes de la inducción. Normalmente se induce a las células durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción mayor o menor.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención pueden modificarse diversas condiciones de la fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento adecuado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para cotransformar a las células hospedadoras procariotas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento adecuado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou et al., la patente de Estados Unidos N° 6.083.715; Georgiou et al., la patente de Estados Unidos N° 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Plucktbun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse determinadas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse las cepas de células hospedadoras para efectuar mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Hay disponibles algunas cepas de *E. coli* deficientes para proteasas y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), anteriormente citado; Georgiou et al., la patente de Estados Unidos N° 5.264.365; Georgiou et al., la patente de Estados Unidos N° 5.508.192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En una realización, Las cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas se usan como células hospedadoras en el sistema de expresión de la invención.

65 (3) Purificación de anticuerpos

En una realización, un anticuerpo producido en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos posteriores. Pueden emplearse métodos de purificación de enzimas convencionales conocidos en la materia. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE, precipitación por sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se usa proteína A inmovilizada sobre una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida sobre la que se inmoviliza la proteína A puede ser una columna que comprende una superficie de vidrio o de sílice, o una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se recubre con un reactivo, tal como glicerol, para prevenir en la medida de lo posible la adherencia no específica de los contaminantes.

En la primera etapa de purificación, puede aplicarse una preparación derivada del cultivo celular, tal como se ha descrito anteriormente, sobre una fase sólida inmovilizada de proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. La fase sólida puede lavarse entonces para eliminar los contaminantes unidos de manera inespecífica a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

b) Generación de anticuerpos usando células hospedadoras eucariotas:

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota incluye generalmente uno o más de los siguientes componentes no limitantes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

(1) *Componente de secuencia de señal*

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia de señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada puede ser una que se reconozca y procese (es decir, que se escinda por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. En la expresión celular en mamífero, están disponibles las secuencias de señal de mamífero, así como líderes de secreción viral, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora está ligado en marco de lectura al ADN que codifica al anticuerpo.

(2) *Origen de replicación*

En general, no es necesario un componente de origen de replicación para los vectores de expresión en mamífero. Por ejemplo, puede usarse normalmente el origen de SV40 solo porque contiene al promotor temprano.

(3) *Componente de gen de selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas de complemento, en los casos donde sean relevantes, o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles en un medio complejo.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman de manera satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneina I y II, preferentemente genes de metalotioneina de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En algunas realizaciones, una célula hospedadora adecuada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente células hospedadoras que contienen DHFR endógeno)

transformadas o transformadas conjuntamente con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo silvestre, y otro marcador de selección, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección, tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de los Estados Unidos nº 4.965.199.

(4) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Por ejemplo, virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25-30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli-A al extremo 3' de la secuencia codificante. En determinadas realizaciones, puede insertarse de manera adecuada cualquiera o todas estas secuencias en vectores de expresión en eucariotas.

La transcripción a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula hospedadora.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la Patente de Estados Unidos Nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos Nº 4.601.978. Véase también Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)), que describe la expresión del ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse como promotor la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

(5) Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta normalmente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) que describe elementos potenciadores para la activación de promotores de eucariotas. El potenciador puede empalmarse en el vector a una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido de anticuerpo, pero generalmente se localiza en un sitio 5' del promotor.

(6) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas pueden contener también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están fácilmente disponibles a partir de las regiones 5' y en ocasiones 3' no traducidas de ADN o ADNc eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en este.

(7) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea celular de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70);

5 células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea celular de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea necesario para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

10 (8) Cultivo de las células hospedadoras

15 Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en diversos medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), Las Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Solicitud de Patente de los Estados Unidos, 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco de GENTAMICINA™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento puede también introducirse en concentraciones adecuadas que serán conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, el pH, y similares, son aquellas usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia.

30 (9) Purificación de anticuerpos

35 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los residuos en partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión pueden concentrarse primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasas, tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

40 La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica conveniente. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62:1 -13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad puede ser agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permite caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. En los casos donde el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en hepatina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE, y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

55 Después de una etapa (o etapas) de purificación preliminar, puede someterse a la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes a purificación adicional, por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5-4,5, efectuada preferentemente a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a aproximadamente 0-0,25 M).

60 En general, están bien establecidas en la técnica varias metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayos y en la clínica, coherentes con las metodologías anteriormente descritas y/o según se consideren adecuadas por un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

65 C. Inmunoconjugados

- Los inmunocombinados, o "combinados de anticuerpo-fármaco", son útiles para la administración local de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer. Véanse, por ejemplo, Syrigos et al. (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz et al. (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; Patente de los Estados Unidos Nº 4.975.278. Los inmunocombinados permiten la administración dirigida de un resto de fármaco a un tumor, mientras que la administración sistémica de agentes citotóxicos no combinados puede dar como resultado niveles no aceptables de toxicidad para células normales así como para las células tumorales que se quieren eliminar. Véase Baldwin et al. (15 de marzo de 1986) *Lancet* págs. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera et al., eds) págs. 475-506.
- En un aspecto, un inmunocombinado comprende un anticuerpo que se une a IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL22R, IL-20Ra, IL-20Rb, o IL-10R2, tal como aquellos proporcionados en el presente documento, y un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngicos, plantas, o animal, o fragmentos de las mismas), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).
- Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunocombinados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Hay disponibles una serie de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re .
- Los combinados del anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando varios agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como diisocianatos de bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina) (tales como 2,6-diisocianato de tolileno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina, tal como se describe en Vitetta et al, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentiainopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.
- Los combinados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliceamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

1. Maitansina y maitansinoides

- En una realización, un inmunocombinado comprende un anticuerpo combinado a una o más moléculas de maitansinoide. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos Nº 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.137.230, 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533, cuyas divulgaciones se han incorporado expresamente al presente documento por referencia.
- En un intento para mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han combinado a anticuerpos que se unen a antígenos en la superficie de células tumorales. Se divulgan inmunocombinados que contienen maitansinoides y sus usos terapéuticos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1, cuyas divulgaciones se han incorporado expresamente al presente documento por referencia. Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) describieron inmunocombinados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se observó que el combinado era elevadamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo *in vivo* de crecimiento tumoral. Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describieron inmunocombinados en los que se combinó un maitansinoide mediante un enlazante disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino, TA.1, que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del combinado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie de HER-2 por célula. El combinado de fármaco logró un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que pudo aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El combinado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica menor en ratones.

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan uniendo químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado eficacia para potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina por anticuerpo potenciaría la citotoxicidad frente al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse usando técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 y en las demás patentes y publicaciones no de patente citadas anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

Se conocen muchos grupos de enlace en la técnica para producir conjugados de anticuerpo-maitansinol, incluyendo, por ejemplo, aquellos divulgados en la Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 o en la Patente EP 0 425 234 B1, y Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas, o grupos lábiles a esterases, tal como se divulgan en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter.

Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden preparar usando varios agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como -succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor biactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Determinados agentes de acoplamiento, incluyendo N-succinimidil-3-(2-piridiltio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), proporcionan un enlace disulfuro.

El enlazante puede unirse a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y en la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o de un análogo de maitansinol.

2. Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una dolastatina o un análogo o derivado peptídico de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (Patentes de Estados Unidos Nº 5.635.483; 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis de GTP, y con la división nuclear y celular (Woyke et al., (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (Patente de Estados Unidos No. 5.663.149) y antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatinas o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N-terminal (amino) o del extremo C-terminal (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones ejemplares de auristatina incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos al extremo N-terminal DE y DF, divulgados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Publicación de Patente de Estados Unidos Nº US 2005-0238649 A1, cuya divulgación se incorpora expresamente por referencia en su totalidad.

Típicamente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schroder y K. Lübke, "The Peptides", Volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármacos de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: el documento US 5635483; el documento US 5.780.588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; and Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Véase también Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784; Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2005-0238649 A1, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad (que divulga, por ejemplo, enlazantes y métodos para preparar compuestos de monometilvalina, tales como MMAE y MMAF conjugados a enlazantes).

3. Caliceamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliceamicina. La familia de antibióticos de caliceamicina es capaz de producir rupturas en el ADN bicatenario a concentraciones por

debajo de picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de caliceamicina, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliceamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, $\gamma_1^1, \alpha_2^1, \alpha_3^1$ N-acetil- γ_1^1 , PSAG and θ_1^1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos de American Cyanamid anteriormente mencionadas). Otro fármaco antitumoral al que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliceamicina como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

4. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse a un anticuerpo incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos N° 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de Estados Unidos N° 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

En otro aspecto, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN, tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva de un tumor, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo anti-FGFR2 y un átomo altamente radioactivo. Está disponible varios isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos anti-FGFR2 radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{212}P , ^{212}Pb e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de gammagrafía, por ejemplo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{123}I , o un marcador de espín para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética nuclear (RMN), IMR), tal como de nuevo yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13 nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los marcadores radioactivos u otros pueden incorporarse en el inmunoconjugado por modos conocidos. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, fluor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{123}I ^{186}Re , ^{188}Re y ^{111}In pueden unirse mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al., (1978) Biochem. Biophys. Res. Common, 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe detalladamente otros métodos.

D. Antagonistas y agonistas

Se proporcionan antagonistas de IL-22. Dichos antagonistas abarcan aquellos que actúan directamente en IL-22 (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22) y aquellos que afectan indirectamente a la actividad de IL-22 (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22R). Dichos antagonistas son útiles, por ejemplo, para 1) tratar trastornos inflamatorios y trastornos autoinmunitarios, y 2) modular la señalización de IL-23 o IL-22. En una realización particular, una composición que comprende un antagonista de IL-22 o IL-22R es útil para reducir la cantidad de tejido psoriasisico en un mamífero. En otra realización particular, una composición que comprende un antagonista de IL-22 o IL-22R es útil para inhibir parcial o totalmente la proliferación de células tumorales.

En un aspecto, un antagonista de IL-22 es un anticuerpo anti-IL-22 o un anticuerpo anti-IL-22R. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-IL-22 es un anticuerpo bloqueante que bloquea total o parcialmente la interacción de IL-22 con su receptor. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-IL-22R es un anticuerpo bloqueante que bloquea total o parcialmente la interacción de IL-22R con IL-22. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-IL-22R se une al dominio de unión a ligando extracelular de un IL-22R. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22R puede unirse al dominio de unión a ligando extracelular de un IL-22R humano, que se encuentra en la SEC ID N°: 3 desde aproximadamente los aminoácidos 18-228.

En otro aspecto, un antagonista de IL-22 es un oligopéptido que se une a IL-22 o IL-22R. En una realización, un oligopéptido se une al dominio de unión a ligando extracelular de IL-22R. Los oligopéptidos pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos tienen al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60,

61, 62, 63, 64, 65 66; 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 aminoácidos de longitud. Dichos oligopéptidos pueden identificarse sin experimentación innecesaria usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se destaca que las técnicas para explorar bibliotecas de oligopéptidos en busca de oligopéptidos que sean capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos N° 5.556.762; 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; Publicaciones PCT N° WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984). Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:178-182 (1985); Geysen et al., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al., (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol, 2:668). En determinadas realizaciones, un oligopéptido puede conjugarse a un agente citotóxico.

En otro aspecto más, un antagonista de IL-22 es una molécula orgánica que se une a IL-22 o IL-22R, distinta de un oligopéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento. Una molécula pequeña puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña. En una realización, una molécula orgánica se une al dominio extracelular de un IL-22R. Puede identificarse y sintetizarse químicamente una molécula orgánica que se une a IL-22 o IL-22R usando metodología conocida (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). Dichas moléculas orgánicas tienen normalmente menos de aproximadamente 2000 Dalton de longitud, como alternativa, menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 Dalton de longitud, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse a IL-22 o IL-22R pueden identificarse sin experimentación innecesaria usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se destaca que las técnicas para explorar bibliotecas de moléculas orgánicas en busca de moléculas que sean capaces de unirse a una diana polipeptídica se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). En determinadas realizaciones, una molécula orgánica puede conjugarse a un agente citotóxico.

En otro aspecto más, un antagonista de IL-22 es un receptor soluble de IL-22, por ejemplo, una forma de IL-22R que no está unida a membrana. Dichas formas solubles de IL-22R pueden competir con IL-22R unido a membrana por la unión a IL-22. En determinadas realizaciones, una forma soluble de IL-22R puede comprender la totalidad o una porción de unión a ligando de un dominio extracelular de IL-22R, por ejemplo, la totalidad o una porción de unión a ligando de un polipéptido que comprende los aminoácidos 18-229 de SEC ID N°: 3. En determinadas realizaciones, una forma soluble de IL-22R carece de un dominio transmembrana. Por ejemplo, una forma soluble de IL-22R humana puede carecer de la totalidad o de una parte sustancial del dominio transmembrana desde los aminoácidos 229-251 de SEC ID N°: 3.

Se ha comunicado un receptor soluble de origen natural para IL-22. Véase Dumoutier L. et al., "Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22", J. Immunol. 166:7090-7095 (2001); y Xu W. et al., "A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:9511-9516 (2001). Ese receptor se denomina bien como "IL-22BP" o como "IL-22RA2" en la técnica. En la Figura 4 se muestra la secuencia de un IL-22BP humano. El término "IL-22BP" o la expresión "proteína de unión a IL-22", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier IL-22BP nativa de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario.

En otro aspecto más, un antagonista de IL-22 es un ácido nucleico antisentido que disminuye la expresión del gen de IL-22 o de IL-22R (es decir, que disminuye la transcripción del gen de IL-22 o IL-22R y/o la traducción del ARNm de IL-22 o IL-22R). En determinadas realizaciones, un ácido nucleico antisentido se une a un ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica IL-22 o IL-22R. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico antisentido es un oligonucleótido de aproximadamente 10-30 nucleótidos de longitud (incluyendo todos los valores entre esos extremos). En determinadas realizaciones, un oligonucleótido antisentido comprende una estructura de azúcar modificado-fosfodiéster (u otros enlaces de azúcar, incluyendo enlaces fosforotioato y enlaces como los descritos en el documento WO 91/06629), en los que dichas estructuras de azúcar modificado-fosfodiéster son resistentes a nucleasas endógenas. En una realización, un ácido nucleico antisentido es un oligodesoxirribonucleótido, que da como resultado la degradación y/o la transcripción o traducción reducida del ARNm que codifica a IL-22 o IL-22R. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico es un ARN que reduce la expresión de un ácido nucleico diana mediante "interferencia de ARN" ("ARNi"). Para una revisión del ARNi, véase, por ejemplo, Novina et al. (2004) Nature 430:161-164. Dichos ARN proceden de, por ejemplo, ARN pequeño interferente (ARNpi) y micro ARN, ARNpi, por ejemplo, pueden sintetizarse como oligorribonucleótidos bicatenarios de aproximadamente 18-26 nucleótidos de longitud. Id.

En otro aspecto más, se proporcionan agonistas de IL-22. Los agonistas ejemplares incluyen, pero sin limitación, IL-22 o IL-22R nativo; fragmentos, variantes, o formas modificadas de IL-22 o IL-22R que mantienen al menos una actividad del polipéptido nativo; agentes que son capaces de unirse y activar a IL-22R; y agentes que inducen la sobreexpresión de IL-22 o IL-22R o ácidos nucleicos que codifican IL-22 o IL-22R.

E. Formulaciones farmacéuticas

Se proporcionan formulaciones farmacéuticas. Una formulación farmacéutica comprende 1) un agente activo, por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos, anticuerpos, agonistas, o antagonistas anteriormente descritos; y 2) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una formulación farmacéutica puede comprender además al menos un agente terapéutico adicional.

Las formulaciones farmacéuticas se preparan para su almacenamiento mezclando un agente que tiene el grado de pureza deseado con vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizantes (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a 10 restos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, la arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

También pueden usarse lipofecciones o liposomas para administrar un agente a una célula. En los casos donde el agente es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente a la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptido que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología del ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]). Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Se preparan liposomas que contienen un anticuerpo mediante métodos conocidos en la materia, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las Patentes de los Estados Unidos Nos 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase reversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de un anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a liposomas, tal como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina) está opcionalmente contenido en el liposoma. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst, 81(19): 1484 (1989).

También puede atraparse un agente en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se han descrito en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden elaborarse preparaciones de liberación sostenida de un agente. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación continua incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen al agente, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continua incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato). o poli(alcohol de vinilo)), polilácticas (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-glicólico tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Una composición farmacéutica del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se esté tratando. Por ejemplo, en un aspecto, una formulación

farmacéutica que comprende más de un compuesto activo comprende 1) al menos un agonista de IL-22, por ejemplo, un anticuerpo que se une a IL-22 y/o un anticuerpo que se une a IL-22R; y 2) al menos un anticuerpo que se une a IL-19, IL-20, IL-24, IL20Ra, IL-20Rb, o IL-10R2 (en el que cualquier número de los anticuerpos listados en 2) puede seleccionarse en cualquier combinación). En otro aspecto, una formulación farmacéutica contiene dos o más compuestos activos que tienen actividades complementarias. Por ejemplo, en una realización, una formulación farmacéutica puede comprender 1) al menos un antagonista de IL-22, por ejemplo, un anticuerpo que se une a IL-22 y/o un anticuerpo que se une a IL-22R; y 2) un antagonista de TNF- α o IL-12. En otro aspecto más, una formulación farmacéutica que contiene más de un compuesto activo puede comprender un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

F. Métodos de tratamiento

Se proporcionan métodos terapéuticos usando cualquiera de las composiciones o formulaciones farmacéuticas anteriores. Dichos métodos incluyen métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, a menos que se indique lo contrario. En varios aspectos, se proporcionan métodos para estimular o inhibir una ruta de señalización mediada por IL-23. Se proporcionan métodos para estimular o inhibir una función celular de Th_{IL-17}. También se proporcionan métodos para tratar trastornos inflamatorios y/o autoinmunitarios. Además se proporcionan métodos de tratamiento asociados con la señalización de IL-23 o IL-22. También se proporcionan métodos de tratamiento mediados por Th_{IL-17}. Estos y otros aspectos de la invención se proporcionan a continuación.

En un aspecto, se proporciona un método para estimular una ruta de señalización mediada por IL-23 en un sistema biológico, comprendiendo el método proporcionar un agonista de IL-22 al sistema biológico. Los sistemas biológicos incluyen, por ejemplo, células de mamífero en un sistema de cultivo *in vitro* o en un organismo *in vivo*. Los sistemas biológicos ejemplares que modelan la psoriasis se proporcionan en los Ejemplos e incluyen epidermis humana reconstituida (EHR) (Ejemplo 14) o modelos animales (Ejemplo 16). En una realización, un agonista de IL-22 es IL-22. En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir una ruta de señalización mediada por IL-23 en un sistema biológico, comprendiendo el método proporcionar un antagonista de IL-22 al sistema biológico. En una realización, el antagonista de IL-22 es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante y/o un anticuerpo anti-IL-22R neutralizante.

En otro aspecto, se proporciona un método para estimular una función celular de Th_{IL-17}, comprendiendo el método exponer a una célula Th_{IL-17} a un agonista de IL-22. En una realización, un agonista de IL-22 es IL-22. En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir una función celular de Th_{IL-17}, comprendiendo el método exponer a una célula Th_{IL-17} a un antagonista de IL-22. En una realización, el antagonista de IL-22 es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante y/o un anticuerpo anti-IL-22R neutralizante. Las funciones celulares de Th_{IL-17} incluyen, pero sin limitación, estimulación de la inmunidad mediada por células (hipersensibilidad de tipo retardado); reclutamiento de células inmunitarias innatas, tales como células mieloides (por ejemplo, monocitos y neutrófilos) a sitios de inflamación; y la estimulación de la infiltración de células inflamatorias a tejidos. En una realización, una función celular de Th_{IL-17} está mediada por IL-23.

En otro aspecto más, se proporciona un método para tratar la inflamación, comprendiendo el método administrar a un mamífero que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-22. En una realización, el antagonista de IL-22 es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante y/o un anticuerpo anti-IL-22R neutralizante. La inflamación incluye, pero sin limitación, inflamación autoinmune (inflamación asociada con un trastorno autoinmune), inflamación crónica, inflamación de la piel, inflamación artrítica (incluyendo inflamación asociada con artritis reumatoide), y respuesta inflamatoria sistémica. En una realización, la inflamación está mediada por IL-23.

En otro aspecto más, se proporciona un método para tratar un trastorno autoinmunitario, comprendiendo el método administrar a un mamífero que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-22. En una realización, el antagonista de IL-22 es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante y/o un anticuerpo anti-IL-22R neutralizante. Los trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación, enfermedad del tejido conectivo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide), inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus insulino dependiente, uveitis, miastenia grave, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad ocular inflamatoria autoinmune, psoriasis, artritis asociada con la autoinmunidad (por ejemplo, artritis reumatoide), inflamación autoinmune del cerebro, y enfermedad inflamatoria del intestino. En una realización, el trastorno autoinmune es un trastorno autoinmune mediado por IL-23.

En un aspecto particular, se proporcionan métodos para el tratamiento de la psoriasis y/o trastornos caracterizados por síntomas psoriásicos. La psoriasis se considera una enfermedad autoinmunitaria en la que las células T del sistema inmunitario reconocen a una proteína en la piel y atacan al área donde se encuentra esa proteína, provocando un crecimiento demasiado rápido de nuevas células de la piel y lesiones dolorosas, elevadas y escamosas. Estas lesiones se caracterizan por la hiperproliferación de queratinocitos y la acumulación de células T activadas en la epidermis de las lesiones psoriásicas. Aunque la causa molecular inicial de la enfermedad es desconocida, se han mapeado vínculos genéticos a al menos 7 locus de susceptibilidad a la psoriasis (Psor1 en 6p21.3, Psor2 en 17q,

Psor3 en 4q, Psor4 en 1 cent-q21, Psor5 en 3q21, Psor6 en 19p13, y Psor7 en 1p). Algunos de estos locus se asocian con otras enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide, dermatitis atópica, y enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Las estrategias actuales al tratamiento de la psoriasis incluye la administración de antagonistas de IL-12 o TNF- α . Véanse, por ejemplo, Nickoloff et al. (2004) J. Clin. Invest. 113:1664-1675; Bowcock et al. (2005) Nat. Rev. Immunol. 5:699-711; Kauffman et al. (2004) J. Invest. Dermatol. 123:1037-1044. Los datos proporcionados en el presente documento, sin embargo, implican una ruta de señalización de IL-23/IL-22 distinta en la patogénesis de la psoriasis. Por consiguiente, los agentes terapéuticos que modulan esta ruta de señalización pueden proporcionar una alternativa a o pueden complementar a otras estrategias para el tratamiento de la psoriasis.

En una realización, un método para tratar la psoriasis comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-22. En una realización, el antagonista de IL-22 es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante y/o un anticuerpo anti-IL-22R neutralizante. En varias realizaciones, el método comprende además administrar (bien en la misma formulación farmacéutica o en una formulación farmacéutica separada) al menos un agente terapéutico adicional. En una de dichas realizaciones, el agente terapéutico adicional es al menos un antagonista de una citocina seleccionada entre IL-19, IL-20, e IL-24. Dichos antagonistas incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo que se une a IL-19, IL-20, IL-24, IL-20Ra, IL-20Rb, o IL-10R2. Puede seleccionarse cualquier número de dichos anticuerpos en cualquier combinación. En otra realización, el agente terapéutico adicional es un agente conocido por ser eficaz en el tratamiento de la psoriasis. Algunos de dichos agentes terapéuticos se describen, por ejemplo, en Nickoloff et al. (2004) J. Clin. Invest. 113:1664-1675; Bowcock et al. (2005) Nat. Rev. Immunol. 5:699-711; y Kauffman et al. (2004) J. Invest. Dermatol. 123:1037-1044. Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, un agente terapéutico que se dirige a células T, por ejemplo, efalizumab y/o alefacept; un antagonista de IL-12, por ejemplo, un anticuerpo bloqueante que se une a IL-12 o a su receptor; y un antagonista de TNF- α , por ejemplo, un anticuerpo bloqueante que se une a TNF- α o su receptor.

En otro aspecto más, se proporciona un método para inhibir la progresión tumoral, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-22. En una realización, el antagonista de IL-22 es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-22 neutralizante y/o un anticuerpo anti-IL-22R neutralizante. En una realización, la progresión tumoral está mediada por IL-23.

Las composiciones de la presente invención (por ejemplo, polipéptidos, anticuerpos, antagonistas agonistas y formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anteriores), se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa en forma de bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por ruta intramuscular, intraperitoneal, intracefalorraquídea, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación (intranasal, intrapulmonar). Se prefiere la administración intravenosa o por inhalación de polipéptidos y anticuerpos.

En determinadas realizaciones, la administración de un agente anticancerígeno puede combinarse con la administración de una composición de la presente invención. Por ejemplo, un paciente que va a tratarse con una composición de la invención también puede recibir un agente anticáncer (agente quimioterapéutico) o radioterapia. La preparación y pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos puede usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o tal como se determine empíricamente por el experto en la materia. Las pautas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración de la composición o puede administrarse simultáneamente con el mismo. Además, puede administrarse un compuesto antiestrógenos, tal como tamoxifeno o una antiprogesterona, tal como onapristona (véase el documento EP 616812) en dosificaciones conocidas para dichas moléculas.

Puede ser deseable administrar también anticuerpos contra otros antígenos asociados con una enfermedad inmunitaria o asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o al factor endotelial vascular (VEGF). Como alternativa, o además, pueden administrarse al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o a dos o más antígenos diferentes divulgados en el presente documento. En determinadas realizaciones, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente. En determinadas realizaciones, se administra conjuntamente una composición de la invención con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse antes, después, o de manera contemporánea con la administración de la composición. Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas que se usan actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y de la composición.

Para el tratamiento o la reducción de la gravedad de una enfermedad inmunitaria, la dosificación adecuada de una composición de la invención dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, del historial clínico del paciente y de la respuesta al compuesto, y de la criterio del médico tratante. El compuesto se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 μ g/kg a 15 mg/kg (por

ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de un polipéptido o anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración a un paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, se mantiene el tratamiento hasta que sucede una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

G. Métodos diagnósticos y métodos de detección

En un aspecto, se proporciona un método para diagnosticar la psoriasis en un mamífero, comprendiendo el método detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido de IL-22 o IL-22R en una muestra de ensayo de células tisulares obtenidas del animal, donde un nivel de expresión mayor en la muestra de ensayo en comparación con una muestra de control (por ejemplo, una muestra de células tisulares normales conocidas del mismo tipo celular) indica la presencia de psoriasis en el mamífero en el mamífero del que se obtuvo la muestra de ensayo. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. En una realización, la muestra de ensayo comprende sangre o suero. En una realización, la detección del nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido de IL-22 o IL-22R comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti-IL-22 o anti-IL-22R con una muestra de ensayo obtenida del mamífero, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y un polipéptido de IL-22 o IL-22R en la muestra de ensayo. El anticuerpo puede unirse a un marcador detectable. La formación de complejos puede controlarse, por ejemplo, mediante microscopía óptica, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en la materia. La muestra de ensayo puede obtenerse a partir de un individuo que se sospecha que tiene psoriasis.

En una realización, la detección del nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido de IL-22 o IL-22R comprende detectar el nivel de transcripción de ARNm del gen. Los niveles de transcripción de ARNm pueden detectarse, bien cuantitativa o cualitativamente, mediante diversos métodos conocidos para los expertos en la materia. Los niveles de transcripción de ARNm también pueden detectarse directa o indirectamente mediante la detección de niveles de ADNc generados a partir del ARNm. Los métodos ejemplares para detectar los niveles de transcripción de ARNm incluyen, pero sin limitación, RT-PCR cuantitativa en tiempo real y ensayos basados en hibridación, incluyendo ensayos basados en micromatrices y ensayos basados en filtros, tales como transferencias de Northern.

En otra realización, la presente invención se refiere a kits diagnósticos que contienen un anticuerpo anti-IL-22 o anti-IL-22R en un envase adecuado. El kit contiene preferentemente instrucciones para usar el anticuerpo para detectar un polipéptido de IL-22 o IL-22R. En un aspecto, el kit diagnóstico es un kit diagnóstico para la psoriasis.

H. Ensayos

1. Ensayos basados en células y modelos animales

Los ensayos basados en células y los modelos animales para enfermedades inmunitarias son útiles para poner en práctica determinadas realizaciones de la invención. Determinados ensayos basados en células proporcionados en los Ejemplos a continuación son útiles, por ejemplo, para ensayar la eficacia de antagonistas o agonistas de IL-22.

Los modelos animales *in vivo* también son útiles para poner en práctica determinadas realizaciones de la invención. Los modelos animales ejemplares también se describen en los Ejemplos a continuación. La naturaleza *in vivo* de dichos modelos los hace predictivos de respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades relacionadas inmunes incluyen animales tanto no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Los modelos animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, modelos de roedor, por ejemplo, murinos. Dichos modelos pueden generarse introduciendo células en ratones singénicos usando técnicas convencionales, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección por la vena caudal, implantación de bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la cápsula renal, etc.

Los modelos de enfermedad de injerto contra hospedador proporcionan un medio para evaluar la reactividad de células T contra antígenos del CMH y antígenos menores del trasplante. La enfermedad de injerto contra hospedador sucede cuando se trasplantan células inmunocompetentes en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Las células donantes reconocen y responden a antígenos del hospedador. La respuesta puede variar desde inflamación con riesgo de muerte a casos leves de diarrea y pérdida de peso. Un procedimiento adecuado para evaluar la enfermedad de injerto contra hospedador se describe detalladamente en Current Protocols in Immunology, anterior, unidad 4.3.

Un modelo para rechazo de aloinjerto de piel es un medio para evaluar la capacidad de las células T para mediar la destrucción *in vivo* de tejido y medir su papel en el rechazo del trasplante. Los modelos más comunes y aceptados usan injertos murinos de piel de cola. Experimentos repetidos han demostrado que el rechazo de aloinjerto de piel está mediado por células T, células T auxiliares y células T eliminadoras efectoras, y no anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. y Sachs, D. H., Fundamental Immunology, 2ª ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY. 1989, 889-992. Se describe detalladamente un procedimiento adecuado en Current Protocols in Immunology, anterior, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo de trasplante que pueden usarse para ensayar los compuestos de la invención son los modelos de

trasplante de corazón alogénico descritos por Tanabe, M. et al, *Transplantation* (1994) 58:23 y Tinubu, S. A. et al, *J. Immunol.* (1994) 4330-4338.

La hipersensibilidad de contacto es un ensayo *in vivo* simple para la función inmunitaria mediada por células (hipersensibilidad de tipo retardado). En este procedimiento, la exposición cutánea a haptenos exógenos da lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo retrasado que se mide y cuantifica. La sensibilidad de contacto implica una fase de sensibilización inicial seguida de una fase de suscitación. La fase de suscitación sucede cuando los linfocitos T encuentran un antígeno con el que han tenido un contacto previo. Aparecen hinchazón e inflamación, haciendo de este un modelo excelente para dermatitis alérgica de contacto. Se describe detalladamente un procedimiento adecuado en *Current Protocols in Immunology*, Eds. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unidad 4.2. Véase también Grabbe, S. y Schwarz, T, *Immun. Today* 19 (1): 37-44 (1998).

Además, las composiciones de la invención pueden ensayarse en modelos animales para enfermedades similares a la psoriasis. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden ensayarse en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. et al, *Nat. Med.* (1997) 3:183, en el que los ratones demuestran lesiones cutáneas histopatológicas que se asemejan a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera de ratón piel/scid preparada tal como se describe por Nickoloff, B. J. et al, *Am. J. Path.* (1995) 146:580. Otro modelo adecuado se describe en Boyman et al., *J Exp Med.* (2004) 199(5):731-6, en el que la piel prepsoriásica se injerta en ratones AGR129, dando lugar al desarrollo de lesiones psoriásicas de la piel.

Pueden construirse animales *knockout* que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en el presente documento, como resultado de la recombinación de homólogos entre el gen endógeno que codifica al polipéptido y una molécula de ADN en la que se ha alterado ese gen. Por ejemplo, puede usarse ADNc que codifica un polipéptido particular para clonar ADN genómico que codifica ese polipéptido de acuerdo con técnicas establecidas. Puede eliminarse o sustituirse una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido particular con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que puede usarse para controlar la integración. Típicamente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (en los extremos tanto 5' como 3') en el vector [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación de homólogos]. El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido se ha recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li et al., *Cell*, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs. 113-152]. Entonces puede implantarse un embrión quimérico en un animal hembra subrogado pseudo-embarazado y se lleva a término el embrión para crear un animal "*knockout*". La descendencia que porta el ADN recombinado de manera homóloga en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de manera homóloga. Los animales *knockout* pueden caracterizarse, por ejemplo, respecto de su capacidad para defender contra determinadas afecciones patológicas y respecto de su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

2. Ensayos de cribado para candidatos a fármacos

Los ensayos de cribado para candidatos a fármacos se diseñan para identificar compuestos que se unen a o forman complejos con un polipéptido identificado en el presente documento o un fragmento biológicamente activo del mismo, o interferir de otro modo con la interacción de un polipéptido con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar candidatos a fármaco de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos sintéticos orgánicos o inorgánicos, incluyendo péptidos, preferentemente péptidos solubles, (fusiones de polipéptido-inmunoglobulina, y en particular, anticuerpos incluyendo, sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Los ensayos pueden llevarse a cabo en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica. Todos los ensayos son comunes en tanto que se refieren a poner en contacto un compuesto de ensayo con un polipéptido identificado en el presente documento en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que un polipéptido interactúe con el compuesto de ensayo.

En ensayos de unión, la interacción es unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, un polipéptido o el compuesto de ensayo se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente se logra generalmente recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido o compuesto de ensayo y dejándola secar. Como alternativa, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico para un polipéptido que va a inmovilizarse, puede usarse para anclar al polipéptido a una superficie sólida. El ensayo se lleva a cabo añadiendo el componente no inmovilizado, que puede marcarse mediante un marcador detectable, para el componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se

termina la reacción, los componentes no reaccionados se eliminan, por ejemplo, mediante lavado y los complejos anclados a la superficie sólida se detectan. Cuando el componente originariamente no inmovilizado porta un marcador detectable, la detección de marcador inmovilizado sobre la superficie indica que ha tenido lugar la compleción. En los casos donde el componente originariamente no inmovilizado no porta un marcador, puede detectarse la formación de complejo, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto de ensayo interactúa pero no se une a un polipéptido particular identificado en el presente documento, puede ensayarse su interacción con esa proteína mediante métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tal como, reticulación, co-inmunoprecipitación, y co-purificación mediante gradientes o columnas cromatográficas. Además, pueden controlarse las interacciones proteína-proteína usando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields y Song, Nature (Londres) 340, 245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)] tal como se divulga por Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consiste en dos dominios modulares físicamente discretos, uno actuando como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levadura descrito en las publicaciones anteriores (citado generalmente como el "sistema de dos híbridos") se beneficia de esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión del gen indicador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor de GAL4-activado depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Está comercialmente disponible a través de Clontech un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos. Este sistema también puede extenderse a dominios de proteína map implicados en interacciones de proteína específicas así como para determinar con precisión restos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Para identificar compuestos que interfieren con la interacción de un polipéptido identificado en el presente documento y otros componentes intra o extracelulares, puede prepararse una mezcla de reacción que contiene al polipéptido y al componente en condiciones que permiten la interacción del polipéptido con el componente. Para ensayar la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la interacción, se prepara la mezcla de reacción en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Si hay una disminución en la interacción del polipéptido con el componente en presencia del compuesto de ensayo, entonces se dice que el compuesto de ensayo inhibe la interacción del polipéptido con el componente.

En determinadas realizaciones, los métodos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido de IL-22 o IL-22R comprende poner en contacto un polipéptido de IL-22 o IL-22R con un agonista candidato o molécula agonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido de IL-22 o IL-22R. Dichas actividades incluyen, pero sin limitación, aquellas descritas en los Ejemplos a continuación.

3. Ensayos de unión a anticuerpo

Pueden llevarse a cabo estudios de unión a anticuerpo en cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de ensayo por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que queda unido, los anticuerpos se hacen preferentemente insolubles antes o después de la competición, de tal forma que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y del analito que permanecen unidos.

Los ensayos en sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína que va a detectarse. En un ensayo en sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une mediante un primer anticuerpo que se inmoviliza sobre un soporte sólido, y posteriormente un segundo anticuerpo se une al analito, formando de este modo un complejo de insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado en sí con un resto detectable (ensayos en sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayo en sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo en sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso, el resto detectable es una enzima.

También puede usarse inmunohistoquímica para determinar la localización celular de un antígeno al que se une un anticuerpo. Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o estar congelada o puede incluirse en parafina y fijarse con un conservante, tal como formalina, por ejemplo. Artículos de fabricación

En otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación que comprende composiciones útiles para el diagnóstico o

tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación contiene un envase e instrucciones. Los envases adecuados incluyen por ejemplo, frascos, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los envases pueden estar formados a partir de varios materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para diagnosticar o tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una

5 bolsa para inyección intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es normalmente un polipéptido, un anticuerpo, un agonista, o un antagonista de la invención. Unas instrucciones o etiqueta sobre, o asociada con, el envase indica que la composición se usa para diagnosticar o tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase

10 que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como suero salino tamponado con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones de uso.

En una realización, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende:

- 15 (a) una composición de materia que comprende un agonista o antagonista de IL-22 o IL-22R;
 (b) un envase que contiene dicha composición; y
 (c) una etiqueta fijada a dicho envase, o un prospecto incluido en dicho envase, que se refiere al uso de dicho antagonista en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la inmunidad o de un cáncer. La composición puede comprender una cantidad eficaz del antagonista.
- 20

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines únicamente ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de modo alguno.

III. Ejemplos

25 Los reactivos disponibles comercialmente citados en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, mediante los números de referencia ATCC es la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), Manassas, VA.

30

EJEMPLO 1: Generación de anticuerpos anti-IL-22 y anti-IL-22R

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a IL-22 o IL-22R. Las técnicas empleadas para producir los anticuerpos monoclonales se basaron en aquellas conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, anteriormente citado. Los inmunógenos empleados fueron IL-22 humana purificada de longitud completa (hIL-22) o IL-22R humano purificado de longitud completa (hIL-22R). En resumen, se inmunizó a ratones con aproximadamente 1-100 microgramos del inmunógeno de hIL-22 o hIL-22R emulsionado en adyuvante. Se reforzó a los ratones inmunizados a los 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en adyuvante. Se obtuvieron muestras de suero de los ratones de manera periódica para ensayarlas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-IL-22 o IL-22R.

35

40

Tras detectar un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para anticuerpos se sacrificaron y se recogieron los esplenocitos. Entonces se fusionaron los esplenocitos (usando polietilenglicol al 35 %) a una línea celular murina de mieloma. Las fusiones generaron células de hibridoma que se clonaron y cultivaron en medio que contenía HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Las células de hibridoma se exploraron en un ELISA con respecto a su reactividad contra IL-22 o IL-22R. (Véase la Figura 5). En la Figura 5 se encuentra un listado de los anticuerpos producidos por estos hibridomas y sus propiedades respectivas.

45

EJEMPLO 2: La señalización de IL-22 se bloquea mediante anticuerpos anti-IL-22

50 La activación de STAT3 es un marcador distintivo de la activación y la señalización intracelular del receptor de IL-22. Se ensayaron los anticuerpos generados contra IL-22 respecto de su capacidad para bloquear la activación de STAT3 inducida por IL-22. Se sembraron células T 293 que expresaban el heterodímero de receptor de IL-22 (hIL-22R/hIL-10R2) a $0,2 \times 10^6$ / pocillo en una placa de 24 pocillos. Las células se transfectaron con un indicador de luciferasa de STAT3 (TK-SIE-SRE-S) usando Lipofectamine 2000™ (Invitrogen). Por tanto, cuando se activa STAT3, las células producirán luciferasa, una actividad enzimática que puede detectarse mediante la adición de luciferina. Una reducción de la actividad de luciferasa significa que STAT3 está bloqueado. Al día siguiente, se añadieron 0,5 nM de hIL-22 (R&D Systems) a cada pocillo junto con 20 µg/ml de anticuerpo. Dieciséis horas después se lisaron las células y se leyeron las muestras en un luminómetro. Los datos mostrados en la Figura 6 son actividad de luciferasa relativa al control interno de renilla, que es una medida de la activación relativa de STAT3. Tal como se muestra en la Figura 6, los anticuerpos 3F11.3, 11H4.4, y 8E11.9 tenían una capacidad bloqueante significativa.

55

60

EJEMPLO 3: Dosis frente a respuesta de anticuerpos anti-IL-22

65 Se ensayó un intervalo de dosis de anticuerpos generados contra IL-22 humana respecto de su capacidad para bloquear a IL-22 humana en un ensayo de activación de STAT3. Se sembraron células 293 que expresaban

hIL-22R/hIL-10R2 a $0,2 \times 10^6$ / pocillo en una placa de 24 pocillos. Las células se transfectaron con un indicador de luciferasa de STAT3 (TK-SIE-SRE-S) usando Lipofectamine 2000™ (Invitrogen). Al día siguiente se añadieron 0,5 nM de hIL-22 (R&D Systems) a cada pocillo junto con diversas concentraciones de los anticuerpos anti-IL-22 3F11, 8E11 o 11H4. El intervalo de concentración para el anticuerpo comenzó a 40 µg/ml con diluciones dobles hasta una concentración final de 0,012 µg/ml. Dieciseis horas después se lisaron las células y se leyeron las muestras en un luminómetro. Los tres anticuerpos muestran una curva de dosis/respuesta similar respecto al bloqueo de la activación de STAT3, tal como se muestra en la Figura 7.

EJEMPLO 4: Dosis frente a respuesta de anticuerpos anti-IL-22

Se ensayó un intervalo de dosis de anticuerpos generados contra IL-22 humana respecto de su capacidad para bloquear a IL-22 murina (mIL-22) en un ensayo de activación de STAT3. Se sembraron células 293 que expresaban mIL-22R/mIL-10Rb a $0,2 \times 10^6$ / pocillo en una placa de 24 pocillos. Las células se transfectaron con un indicador de luciferasa de STAT3 (TK-SIE-SRE-S) usando Lipofectamine 2000™ (Invitrogen). Al día siguiente se añadieron 0,5 nM de mIL-22 (marcado con polihistidina) a cada pocillo junto con diversas concentraciones de anticuerpo 3F11, 8E11 o 11H4. El intervalo de concentración para el anticuerpo comenzó a 40 µg/ml con diluciones dobles hasta 0,012 µg/ml. Dieciseis horas después se lisaron las células y se leyeron las muestras en un luminómetro. La Figura 8 muestra que los anticuerpos anti-IL-22 reaccionaron de manera cruzada con IL-22 murina y mostraron una curva de dosis/respuesta similar, pero no tan robusta. Esto demuestra que los anticuerpos anti-IL-22 pueden usarse en experimentos murinos.

EJEMPLO 5: Afinidad de anti-IL-22 por IL-22 humana

La Figura 9 muestra la afinidad de anti-IL-22 por IL-22 humana. La afinidad se midió mediante un análisis BIAcore. Se inmovilizaron diversas cantidades de IgG anti-IL-22 sobre una microplaca CM5 (845 UR (unidades de respuesta) para IgG 11H4, 1933 UR para IgG 8E11, y 7914 UR para IgG 3F11) mediante química de acoplamiento de clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Se prepararon diluciones seriadas dobles de IL-22 abarcando el intervalo de 0,5 - 250 nM. Las muestras de antígeno se inyectaron sobre la superficie con IgG inmovilizada a un caudal de 20 µl/min durante 6 minutos, y se dejó que se disociasen los complejos unidos durante 10 minutos. Las superficies de IgG se regeneraron con Gly 10 mM, pH 1,5 después de cada ciclo de inyección de antígeno. Como celda de flujo de control negativo, se inmovilizó una IgG irrelevante (injerto de 3A5 RF) para restar la respuesta de fondo. El tampón de ejecución, PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % con Na₃N al 0,01 % se usó para todas las diluciones de muestra y el experimento de unión se llevó a cabo a 25°C. Los datos se analizaron mediante ajuste global con un modelo de unión 1:1. Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-IL-22 tienen muy buena afinidad respecto a IL-22 humana.

EJEMPLO 6: Los anticuerpos anti-IL-22 detectan a IL-22 en la célula

Se ensayaron los anticuerpos anti-IL-22 respecto de su capacidad para detectar IL-22 intracelular. Para la tinción FACS intracelular de IL-22, se usaron las siguientes líneas celulares 293: Células que expresan hIL-22-GFP, mIL-22-GFP, mIL20-GFP, y únicamente GFP. Los anticuerpos ensayados fueron los anticuerpos anti-IL-22 humana 3F11, 8E11, y 17F6. Se usó anti-gp120 de ratón como control de isotipo. El anticuerpo secundario usado fue una IgG-PE anti-ratón de Jackson labs. Las células se incubaron con Brefeldina A durante 2 horas, se lavaron en PBS, y después se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante toda la noche a 4°C. Entonces se recogieron las células en PBS, y se incubaron en 5 ml de Tween-20 al 0,2 % durante 30 minutos a 37°C. La tinción de anticuerpos se llevó a cabo durante 30 minutos a 4°C, después se lavó con solución de Tween-20. Las células se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron en un dispositivo FACScan. La Figura 10 muestra los resultados de FACS. Los resultados de FACS demuestran que los anticuerpos 3F11 y 8E11 provocan un cambio en el patrón de tinción celular, lo que indica que estos anticuerpos se unen a IL-22 intracelular tanto murina como humana.

Se usó el anticuerpo 3F11 anti-IL-22 en experimentos adicionales de tinción celular. En anticuerpo 3F11 se conjugó con Alexa 647, un fluoróforo de ficoeritrina. Se usó IgG2a de ratón conjugada a Alexa 647 como control de isotipo (Caltag). Se ensayaron líneas celulares 293 que expresaban hIL-22-GFP y solo GFP respecto a su unión al anticuerpo 3F11. Las células 293 se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 30 minutos, después se lavaron dos veces con PBS/FCS al 2 %. Las células se resuspendieron en saporina al 0,5 % durante 15 minutos. Se añadió suero normal de ratón durante otros 15 minutos, y después se añadieron los anticuerpos a 0,5 µg/millón de células durante 30 minutos. Las células se lavaron y resuspendieron en tampón FACS y se analizaron en un dispositivo FACScan. La Figura 11 muestra en el panel inferior izquierdo un cambio en las células al cuadrante superior derecho. Este resultado indica que el anticuerpo 3F11 conjugado se está uniendo a IL-22 intracelular.

EJEMPLO 7: expresión de IL-22 en células T Th1

Cuando las células T CD4+ maduran en el timo y entran en el sistema linfático periférico, mantienen generalmente su fenotipo nativo antes de que se encuentren con antígenos específicos para su receptor de células T (TCR) [Spren et al., Annu Rev Immunol. (2002); 20:551-79]. La unión del TCR a antígenos específicos presentados por células presentadoras de antígenos (APC), provoca la activación de las células T. Dependiendo del ambiente y de la

estimulación de citocinas, las células T CD4+ pueden diferenciarse en un fenotipo Th1 o Th2 y se convierten en células efectoras o de memoria [Sprenst et al., Annu Rev Immunol. (2002); 20:551-79 y Murphy et al., Nat Rev Immunol. (2002) Dic;2(12):933-44]. Este proceso se conoce como activación primaria. Al someterse a la activación primaria, las células T CD4+ se convierten en células efectoras o de memoria, y mantienen su fenotipo como Th1 o Th2. Una vez que estas células se encuentran de nuevo con un antígeno, se someten a activación secundaria, pero esta vez la respuesta al antígeno será más rápida que la activación primaria y dará como resultado la producción de citocinas efectoras, según se determine por la activación primaria [Sprenst et al., Annu Rev Immunol. (2002); 20:551-79 y Murphy et al., Annu Rev Immunol. 2000;18:451-94]. Varios estudios han descubierto que durante la activación primaria y secundaria de las células T CD4+ la expresión de diversos genes es variable [Rogge et al., Nature Genetics. 25, 96 -101 (2000) y Ouyang et al., Proc Natl Acad Sci USA. (1999) 30 de Mar;96(7):3888-93].

Para las condiciones de activación primaria, las células T no expuestas previamente pueden activarse mediante Ova y APC. En ARN aislado de las células en esta condición puede proporcionar información acerca de qué genes se regulan de manera diferencial durante la activación primaria, y qué citocinas afectan a la expresión génica durante el desarrollo de Th1 y Th2. Después de la activación primaria, las células T CD4+ pueden mantenerse en cultivo. Ya que la activación anterior y el tratamiento de citocinas ha dejado su impronta en estas células, se convierten bien en células efectoras o de memoria. Durante este periodo, debido a que no hay APC o antígenos, las células T CD4+ entran en un estado de reposo. Este estado de reposo proporciona información acerca de las diferencias entre células no expuestas previamente frente a células de memoria, y acerca de las células Th1 de memoria en reposo frente a las Th2 de memoria en reposo. Las células Th1 y Th2 de memoria en reposo se someten entonces a activación secundaria con anticuerpos anti-CD3/CD28 o a estimulación con las citocinas IL12/IL18. Estas condiciones proporcionan información acerca de las diferencias entre células T de memoria activadas no expuestas previamente y activadas, y las diferencias entre células Th1 de memoria activadas frente a Th2 de memoria activadas.

Para el experimento mostrado en la Figura 12, se aislaron esplenocitos de ratones DO11.10 y se activaron mediante OVA en condiciones de Th1: [IL-12 (1 ng/ml), IFN- γ , and IL-4 (1 μ /ml)]; condiciones de Th0: [(anti-IL12, anti-IFN- γ , y anti-IL4)]; o condiciones de Th2: [(anti-IL-12 (0,5 μ g/ml), anti-IFN- γ , e IL-4 (5 ng/ml)]. El ARN se recogió 48 horas después (estimulación primaria). El resto de las células se mantuvieron en cultivo hasta el día 7, y después volvieron a estimularse (activación secundaria) mediante OBA y esplenocitos de Balb/c irradiados. También se estimuló a un subconjunto de células de las condiciones de Th1 mediante IL-12 e IL-18 solamente. 48 horas después se recogió el ARN. Se analizó la expresión de IL-22, IFN- γ , e IL-4 en estas muestras de ARN mediante análisis de nucleasa 5' (TaqMan™). En primer lugar se normalizó la expresión contra sondas de HPRT de gen constitutivo, después se representaron gráficamente como aumento múltiplo en comparación con el nivel de expresión de los esplenocitos. El resultado se muestra en la Figura 12, y los datos demuestran que IL-22 está altamente expresada en las células Th1 tras la estimulación secundaria. Por lo tanto, los agentes terapéuticos anti-IL-22 podrían ser útiles para dirigirse a estas células, bien para el tratamiento de trastornos mediados por Th1 cuando sea deseable eliminar células Th1 de la sangre o como agente diagnóstico para trastornos mediados por Th1 cuando se sospecha que IL-22 desempeña un papel.

EJEMPLO 8: IL-22 se produce por células T $\gamma\delta$

Para analizar la expresión de IL-22 en células T $\gamma\delta$, se aislaron células de bazo de ratón y se separaron las células T $\gamma\delta$ mediante clasificación MACS. GL4 es un anticuerpo anti-TCR de $\gamma\delta$ que activa específicamente a células T $\gamma\delta$ (Becton-Dickenson). Se usó el kit de aislamiento de ARN MINI de Qiagen para aislar ARN de las células para análisis de nucleasa 5' (TaqMan™). Se usó reactivo de mezcla maestra de RT-PCR Master Mix one-step (Applied Biosystems; 4309169) y se usaron los genes constitutivos RPL10 y SPF31 para la normalización. Se usaron esplenocitos completos para determinar el nivel relativo de expresión de IL-22. La Figura 13 muestra que IL-22 está altamente expresada en células T $\gamma\delta$ estimuladas con anticuerpo GL4.

EJEMPLO 9: IL-22 se produce por células T humanas activadas

Las micromatrices de ácido nucleico son útiles para identificar genes expresados de manera diferencial en tejidos enfermos en comparación con sus homólogos normales. Para el uso de micromatrices de ácido nucleico, las muestras de ARNm de ensayo y de control de muestras de tejido de ensayo y de control se retrotranscriben y marcan para generar sondas de ADNc. Entonces se hibridan las sondas de ADNc a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. La matriz se configura de tal manera que la secuencia y posición de cada miembro de la matriz son conocidas. Por ejemplo, puede disponerse en forma de matriz una selección de genes que se sabe que se expresan en determinadas patologías sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro concreto de la matriz indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda de una muestra de ensayo (en este caso, células T CD4+ activadas) es mayor que la señal de hibridación de una sonda de una muestra de control (en este caso, células T CD4+ no estimuladas), se identifican el gen o los genes sobreexpresados en el tejido de ensayo. La implicación de este resultado es que una proteína sobreexpresada en un tejido de ensayo es útil no solo como marcador diagnóstico respecto de la presencia de la patología, sino también como diana terapéutica para el tratamiento de la patología.

La metodología de la hibridación de ácidos nucleicos y de la tecnología de micromatrices se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, se describe detalladamente la preparación específica de ácidos nucleicos para hibridación y las sondas,

portaobjetos, y condiciones de hibridación en la Solicitud de Patente PCT con Número de Serie PCT/US01/10482, presentada el 30 de marzo de 2001, y que se incorpora al presente documento por referencia.

5 En este experimento, se purificaron células T CD4+ a partir de un solo donante usando el protocolo RossetteSep™ de Stem Cell Technologies (Vancouver BC) que usa anticuerpos anti-CD8, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36 y anti-CD56 para aislar células T CD4+. Las células T CD4+ aisladas se activaron con un anticuerpo anti-CD3 (usado a una concentración que no estimula la proliferación) junto con ICAM-1 o anticuerpo anti-CD28. A las 24 o 72 horas se recogieron los pocillos, se extrajo el ARN y se ejecutó el análisis en placas de micromatriz Affimax (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). Las células no estimuladas (en reposo) se recogieron inmediatamente después de la purificación, y se sometieron al mismo análisis. Se compararon los genes cuya expresión estaba regulada positivamente en 10 cualquiera de los dos instantes en células activadas frente a células en reposo.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 14: Los resultados de la micromatriz apoyan y complementan a los datos del Ejemplo 7. Las células T Th1 producen una gran cantidad de IL-22 cuando se estimulan, a diferencia de las células Th2 que producen IL-4 o IL-5. Este resultado podría permitir la diferenciación de trastornos 15 inmunitarios relacionados con Th1 y Th2 basándose en el perfil de citocinas. Las células Th1 que expresan IL-22 e IFN- γ podrían tratarse mediante agentes terapéuticos dirigidos a estas citocinas, sin afectar a la población de células Th2.

20 **EJEMPLO 10: Las células Th1 expresan IL-22 intracelular**

Para determinar el nivel de expresión de IL-22 en células T mediante FACS, se llevó a cabo una tinción intracelular en células Th1/Th2 murinas. Los esplenocitos primarios se polarizaron a Th1 o Th2. Para la tinción de FACS, se sembró 1 millón de células por pocillo en una placa de 96 pocillos, y se trataron con PMA/Ionomicina durante 2 horas, después 25 con Brefeldina A durante otras 2 horas. Los anticuerpos usados fueron anti-IL-22 humana (anticuerpo 3F11.1) y anti-gp120 como control. Se obtuvieron anti-IFN- γ de ratón- FITC y anti-IL-4 de ratón-PE a través de BD Bioscience (San Diego CA). Se usó IgG de cabra anti-ratón conjugada a PE (también de BD Bioscience) como anticuerpo secundario. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 30 minutos, después se lavaron dos veces con PBS/FCS al 2 %. Las células se resuspendieron en saporina al 0,5 % durante 15 minutos, y después se añadieron los 30 anticuerpos a 0,5 μ g/millón de células durante 30 minutos. Después se lavaron dos veces las células y se añadió el anticuerpo secundario en saporina al 0,5 % durante 15 minutos. Finalmente, las células se lavaron y resuspendieron en tampón FACS y se analizaron en un dispositivo FACScan. Los paneles superiores en la Figura 15 muestran que las células Th1 pueden diferenciarse de las células Th2. Las células Th1 son positivas para IFN- γ , negativas para IL-4, y positivas para IL-22. Las células Th2 son principalmente negativas para IFN- γ , positivas para IL-4, y negativas para 35 IL-22.

EJEMPLO 11: Generación de anti-receptor de IL-22 (IL-22R)

Para ensayar la unión de anticuerpos anti-IL-22R, se usaron células 293 que expresaban hIL-22R y células que expresaban GFP. Se tiñó un millón de células con diferentes anticuerpos anti-hIL-22R a una concentración de 0,3 40 μ g/millón de células. Los anticuerpos ensayados fueron 7E9, 8A12, 8H11, y 12H5. El anticuerpo secundario fue de cabra anti-ratón conjugado a PE (Jackson Labs) usado a un factor de dilución de 1:200. Las células se lavaron y tiñeron en tampón de FACS (BSA/PBS al 0,5 %). La tinción con los anticuerpos de ensayo se llevó a cabo durante 15 minutos a 4°C, después se lavaron las células, y se añadió el anticuerpo secundario durante otros 15 minutos a 4°C. 45 Las células se lavaron dos veces antes del análisis en el FACScan. Los resultados se muestran en la Figura 16. Para cada gráfica en la que los picos no se solapan, el pico de la izquierda corresponde al control, y el pico de la derecha corresponde al anticuerpo de ensayo. La Figura 16 muestra que todos los cuatro anticuerpos anti-IL-22R ensayados fueron positivos respecto de la unión a IL-22R en células 293 transfectadas. Los anticuerpos 7E9, 8A12, 8H11, y 12H5 proporciona una buena unión con muy poco fondo.

50 **EJEMPLO 12: Anticuerpos de bloqueo de IL-22R**

Para ensayar la actividad de bloqueo de los anticuerpos anti-IL-22R, se usó una construcción indicadora de luciferasa (tal como se describe en el Ejemplo 2). Si un anticuerpo tiene actividad bloqueante, no se activará STAT3 y la 55 respuesta de luciferasa será baja. Se emplacaron células que expresaban hIL-22R/hIL10Rb a $0,2 \times 10^6$ / pocillo en una placa de 24 pocillos y se transfectaron los indicadores de luciferasa, TK-SIE- SRE-S (0,8 μ g/pocillo) y RL-TK-Luc (0,16 μ g/pocillo) a las células. Al día siguiente se añadió hIL-22 a los pocillos a 0,5 nM, y se añadió cada anticuerpo a 20 μ g/ml. Los anticuerpos anti-IL-22R ensayados fueron; 7E9, 8A12, 8H11 y 12H5. Los anticuerpos de control usados fueron GP120 y 11H4, un anticuerpo anti-ML-22 que demostró tener actividad bloqueante en el Ejemplo 2. Dieciseis 60 horas después se lisaron las células y se leyeron las muestras en un luminómetro para detectar la actividad de luciferasa. La Figura 17 muestra que todos los cuatro anticuerpos anti-IL-22R ensayados bloquearon la interacción IL-22R-IL-22.

65 **EJEMPLO 13: IL-22R se expresa en queratinocitos primarios**

Los queratinocitos son la población de células que prolifera en exceso durante la psoriasis. Los agentes terapéuticos

que se dirigen a los queratinocitos son útiles para el alivio de la psoriasis. La expresión de IL-22R en queratinocitos primarios humanos se determinó mediante análisis FACS. Se obtuvieron queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK), lote de donante 0526, de Cascade Biologics, pase N° 2, crecidos hasta un 80 % de confluencia, y se tiñeron 300-600 mil células por muestra. Se usó suero anti-IL-22R a una dilución de 1:50 y se usó el suero de sangre extraída previamente a una dilución de 1:50 como control. Para la tinción de IL-10R2, se usó anticuerpo de R&D (clon N° 90220, IgG 1 murina) a 0.3 µg por muestra con control de isotipo de IgG1 murina-PE (BD Pharmingen N° 33815X). El anticuerpo secundario para el suero anti-IL-22R fue de rata anti-IgG1 de ratón-PE (BD Pharmingen N° 550083), usado a 0,1 µg por muestra. La Figura 18 muestra que IL-22R e IL10R2 se expresan en NHEK. Por tanto, el bloqueo de IL-22R o IL-22 puede ser útil para aliviar trastornos asociados con la hiperproliferación de queratinocitos, tal como psoriasis.

EJEMPLO 14: Efecto de IL-22 en cultivos epidérmicos

Puede usarse epidermis humana reconstituida (EHR) como modelo para los efectos de las citocinas sobre la piel. La EHR y los medios de cultivo se obtuvieron de MatTek Corporation (Ashland, MA). La EHR se equilibró durante toda la noche (20-22 h) con 0,9 ml de medio a 37°C, CO₂ al 5 %, para que se recuperase del transporte antes del comienzo del experimento y después se cultivó en una interfaz de aire-líquido con 5 ml de medio a 37°C, CO₂ al 5 %. Se ensayó el efecto de IL-22 en la EHR usando tres condiciones diferentes. Se añadió IL-22 (1,2 nM) o factor de crecimiento epidérmico (EGF- R&D Systems) (1 nM) al medio. El control consistió en medio no tratado. La EHR se cultivó durante 4 días, cambiando el medio cada dos días, añadiendo EGF o IL-22 reciente. Se recogió la EHR, se fijó en formalina tamponada neutra al 10 % (NBF) durante toda la noche, se seccionó, y se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E). La Figura 19 muestra que el tratamiento con IL-22 provoca un engrosamiento de la epidermis. Esto indica que la IL-22 provoca hiperplasia, o proliferación de las células que forman la epidermis.

Cuando estas secciones se tiñeron respecto a citoqueratina 16 (K16), un marcador para proliferación de queratinocitos, las EHR tratadas con IL-22 mostraron una tinción más significativa para K16. K16 se expresa solo en células de la piel en proliferación, tal como en la psoriasis y curación de heridas (revisado en Freedberg et al., Soc. Invest. Derm. 116:633-640 (2001)). La Figura 20 muestra la tinción de K16 en EHR tratada con IL-22 en relación a EHR no tratada y tratada con EGF. La EHR tratada con IL-22 mostró K16 por todo el tejido, mientras que la tinción se localiza en las secciones no tratadas y tratadas con EGF.

El tratamiento de la EHR con IL-22 también induce a psoriasina, un gen altamente expresado en la psoriasis. La psoriasina (S100A7) se descubrió originalmente como una proteína expresada en la psoriasis pero no en la piel normal (Madsen P., et al., J. Invest. Derm. 97: 701-712 (1991)). La psoriasina se expresa en queratinocitos cultivados activados y malignos, y en células epiteliales de mama malignas (Watson et al., Int. J. of Biochem. and Cell Bio. 30:567-571 (1998)). Los datos actuales soportan un papel para la psoriasina en la enfermedad inflamatoria de la piel, la quimiotaxis, y la progresión de tumores mamarios. La correlación de la psoriasina con la hiperplasia psoriasiforme de la piel sugiere un papel en la diferenciación de queratinocitos. La psoriasina también puede ser quimiotáctica, estimulando la infiltración de neutrófilos y de linfocitos T CD4+ de la epidermis, que es un rasgo característico de la psoriasis. La Figura 21 muestra que el tratamiento de la EHR con IL-22 induce niveles elevados de expresión de psoriasina. Este resultado confirma el papel que desempeñan IL-22 e IL-22R en la psoriasis.

El efecto inductor de la ruta de IL-22 en la psoriasina puede bloquearse mediante anticuerpos dirigidos a IL-22 o IL-22R. El anticuerpo anti-IL-22 8E11 administrado a una concentración de 20 µg/ml redujo la expresión de psoriasina a niveles indetectables (véase la Figura 23). Cuando se usa a una concentración de 20 µg/ml, el anticuerpo anti-IL-22R (7E9) también redujo de manera significativa la expresión de psoriasina, tal como se muestra en la Figura 23.

Los anticuerpos anti-IL-22 y anti-IL-22R se ensayaron para determinar si podían reducir el engrosamiento epidérmico observado cuando se trata a la EHR con IL-22. El anticuerpo anti-IL-22 (8E11) administrado a una concentración de 20 µg/ml mostró una reducción significativa del engrosamiento epidérmico (véase la Figura 24). La EHR tratada con IL-22 alcanzó un grosor de 80-90 µm, y el tratamiento con anticuerpo anti-IL-22 (8E11) reduce el grosor de la EHR a 50-60 µm (Figura 25). El anticuerpo anti-IL-22R (7E9) también redujo el engrosamiento de la piel. Cuando se usa a una concentración de 20 µg/ml, el anticuerpo anti-IL-22R redujo el espesor de la EHR de 80-90 µm a 55-60 µm (Figura 25). Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-IL-22 o anti-IL-22R pueden aliviar los síntomas asociados con la psoriasis, tales como la proliferación y engrosamiento epidérmico.

EJEMPLO 15: Análisis por micromatriz de genes inducidos por IL-22

Para determinar qué genes se indujeron mediante IL-22, se emplacaron queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) procedentes de un solo donante y se trataron a un 70 % de confluencia durante 24 h con 20 ng/ml de IL-22. Los medios y los suplementos (EpiLife® + HKGS) se obtuvieron de Cascade Biologies™ (Portland, OR). Las células se lavaron y lisaron. El ARN total se purificó de las células NHEK usando el kit RNeasy Mini de Qiagen. En ARN se sometió a análisis de micromatriz, y se cuantificó la cantidad de expresión génica (véase el Ejemplo 9 anterior para una descripción del análisis de micromatriz).

La psoriasina se induce 81 veces más tras la estimulación por IL-22. SPR-2G está regulada positivamente 11 veces.

(Véase la Figura 22). Estos resultados indican que la ruta de IL-22 está implicada en la psoriasis. Por tanto, los antagonistas y anticuerpos antagonistas dirigidos contra IL-22 o IL-22R son útiles para aliviar la psoriasis.

EJEMPLO 16: IL-23 induce rasgos característicos de la psoriasis *in vivo*

Se usó un modelo de ratón para comparar la capacidad de IL-12 e IL-23 para inducir características de la piel psoriásica. Se inyectó a ratones C57B1/6 por vía subcutánea en la oreja con 500 ng de IL-12 recombinante o IL-23 recombinante en un volumen total de 20 μ l de PBS. A los ratones de control se les inyectó solamente 20 μ l de PBS. Se inyectó a los ratones una vez cada dos días durante 16 días. Cada grupo experimental consistió en cinco ratones. El espesor de la oreja se midió antes y en múltiples instantes después de la inyección con un calibre (Mitutoyo America Corporation) y se comunica como media \pm desviación estándar. Para este experimento y para los experimentos posteriores, la significación estadística se calculó mediante ANOVA de una vía o de dos vías usando el programa informático Prism (GraphPad). Todos los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron significativos. Se recogieron las orejas de ratón para análisis histológicos rutinarios usando tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

Tal como se muestra en la Figura 26A, la inyección tanto de IL-12 como de IL-23 indujo un aumento significativo en el grosor de la oreja tan pronto como una semana después de la primera inyección. Para los ratones que recibieron IL-12, p fue de $< 0,001$ (días 12, 14 y 16 frente al control de PBS respectivamente). Para los ratones que recibieron IL-23, p fue de $< 0,001$ (días 8, 12, 14 y 16 frente al control de PBS respectivamente). Los análisis histológicos revelaron que las orejas inyectadas con IL-12 e IL-23 desarrollaron una infiltración de células inflamatorias y un engrosamiento epidérmico (acantosis) marcados en comparación con el grupo de control tratado con PBS; sin embargo, hubo algunas diferencias histológicas evidentes entre estos dos grupos. En primer lugar, IL-12 indujo una acantosis de leve a moderada con una infiltración marcada, predominantemente de células inflamatorias dérmicas mononucleares (Fig. 26D, E) en comparación con el grupo de control tratado con PBS (Fig. 26B, C), mientras que IL-23 indujo una acantosis marcada con una infiltración mixta de células inflamatorias dérmicas de muchos leucocitos polimorfonucleares (Fig. 26F, G), incluyendo tanto neutrófilos (flechas) como eosinófilos. La hiperplasia epidérmica y la presencia de leucocitos polimorfonucleares son rasgos histológicos característicos de la psoriasis en seres humanos, así como hallazgos histológicos muy comunes en modelos de ratón para psoriasis. Véase P. C. van de Kerkhof et al., *Dermatologica* 174: 224 (1987) y P. R. Mangan et al., *Nature* (2006) 441:235.

EJEMPLO 17: IL-22 actúa aguas abajo de IL-23 *in vivo*

Para identificar citocinas que actúan potencialmente aguas abajo de IL-12 o IL-23, se usó PCR en tiempo real para examinar la expresión de un panel de citocinas de muestras de piel de la oreja inyectadas con IL-12 o IL-23. Las inyecciones en la piel de la oreja y el análisis histológico se llevaron a cabo tal como se describe en el Ejemplo anterior. En el día 8 del experimento, se aisló el ARN de orejas individuales de ratón y se llevó a cabo la PCR en tiempo real para cuantificar los niveles de ARNm que codifica IFN- γ , IL-17, e IL-22. Específicamente, el ARN se aisló con el kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT-PCR en tiempo real se llevó a cabo usando un sistema de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con cebadores y sondas que usaban reactivos de mezcla maestra TaqMan™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystems). Las reacciones se ejecutaron en duplicado y las muestras se normalizaron al gen constitutivo de control RPL-19 y se comunicaron de acuerdo con el método de AACT.

Tal como se muestra en la Figura 27A, IL-12 indujo un aumento significativo en la expresión de IFN- γ en la oreja ocho días después de la primera inyección. IL-23 indujo la producción IL-17 e inhibió la producción de IFN- γ en relación al grupo de control tratado con PBS (Fig. 27A). Interesantemente, IL-22 también se reguló positivamente de manera significativa después de la inyección de IL-23, pero no después de la inyección de IL-12 (Fig. 27A). Estos datos sugieren una relación entre IL-23 e IL-22.

Para confirmar que las citocinas se producían por linfocitos que se habían infiltrado en la oreja, se eluyeron los linfocitos de las orejas tratadas y se midió la producción de citocinas mediante ELISA tras la activación. De manera coherente con los datos de la RT-PCR en tiempo real, las células de las orejas inyectadas con IL-23 produjeron preferentemente IL-22 e IL-17, mientras que las células de orejas inyectadas con IL-12 secretaron grandes cantidades de IFN- γ (Fig. 28).

EJEMPLO 18: IL-22 induce inflamación dérmica e hiperplasia epidérmica *in vivo*

Para determinar si IL-22, al igual que IL-23, es capaz de inducir rasgos de la piel psoriásica *in vivo*, se inyectó a los ratones por vía subcutánea en la oreja con IL-22 o solo con PBS, tal como se describe en el Ejemplo 16 anterior. Tal como se muestra en la Figura 27B, IL-22 indujo un aumento significativo en el espesor de la oreja en comparación con el grupo tratado con PBS. IL-20, otra citocina de la familia de IL-10, solo indujo un aumento muy leve y localizado en el espesor de la oreja. Este hallazgo contrastaba con un informe previo donde la sobreexpresión transdérmica epidérmica de IL-20 indujo una hiperplasia epidérmica marcada, un resultado que sugería que IL-20 podría desempeñar potencialmente un papel en la función epidérmica así como en la psoriasis. Véase Blumberg et al., *Cell* 104:9 (2001). El análisis histológico mostró que las orejas de ratones tratados con IL-22 tenían una apariencia histológica similar a las orejas en el grupo tratado con IL-23 mostrado en la Figura 26F y G, mostrando una acantosis

marcada y una infiltración mixta de células inflamatorias dérmicas (Fig. 27G, H), incluyendo muchos neutrófilos (flechas) y algunos eosinófilos. Por el contrario, las orejas tratadas con IL-20 tenían únicamente una acantosis focal de leve a moderada e inflamación mixta muy focal (Fig. 27D, E) en relación al grupo tratado con PBS (Fig. 27C, F). Estos datos sugieren que IL-22 es esencial para la inflamación de la piel y la acantosis inducida por IL-23.

5

EJEMPLO 19: Un anticuerpo bloqueante anti-IL-22 redujo significativamente la acantosis inducida por IL-23

Para confirmar que IL-23 actúa a través de IL-22 para inducir rasgos de la piel psoriásica, se examinó el efecto del anticuerpo monoclonal anti-IL-22 8E11 en la inflamación dérmica y la acantosis inducida por IL-23. Se inyectó a los ratones por vía subcutánea en la oreja con IL-23 o PBS tal como se describe anteriormente (Ejemplo 16), excepto que las inyecciones se llevaron a cabo durante un lapso de tiempo de 14 días. Se inyectó a los ratones también por vía intraperitoneal con anticuerpo 8E11 o con anticuerpo monoclonal de control del isotipo IgG 1 a una concentración de 200 µg por ratón y a una frecuencia de una vez cada dos días durante 14 días. En el día 14, se recogieron las orejas de ratón para análisis histológico usando tinción de H&E.

15

Tal como se muestra en la Figura 29A, 8E11 ("mAb anti-IL-22") redujo significativamente la acantosis epidérmica inducida por IL-23 (*p < 0,001) en relación al tratamiento con anticuerpo de IgG 1 de control. (Compárense también las Figuras 29D y E (mAb anti-IL-22) con B y C (IgG 1 de control)). Además, los ratones tratados con mAb anti-IL-22 también demostraron una disminución moderada en la inflamación dérmica. Sin embargo, los ratones tratados con mAb anti-IL-22 siguieron mostrando una infiltración de células inflamatorias moderada cuando se compararon con pieles de oreja tratadas con PBS. (Compárense las Fig. 29D y E (mAb anti-IL-22) con F y G (PBS)).

20

EJEMPLO 20: La acantosis inducida por IL-23 se redujo significativamente en ratones deficientes para IL-22

Para confirmar adicionalmente que IL-23 actúa a través de IL-22 para inducir rasgos de la piel psoriásica, se examinó el efecto de IL-23 en ratones tanto de tipo silvestre como deficientes para IL-22. Los ratones deficientes para IL-22 (es decir, ratones *knockout* para IL-22 homocigotos, citados como "IL-22^{-/-}") se generaron mediante alteración génica dirigida de acuerdo con la estrategia ilustrada en la Figura 30A. Se sustituyeron los exones 1-4 (cajas cerradas) de la secuencia codificante de IL-22 con un casete de resistencia a neomicina flaqueado por sitios de loxP. Se cruzó a los ratones heterocigotos que portaban el alelo condicional con una línea transgénica en la que el promotor de protamina 1 (Prm) dirigía a la recombinasa Cre. El alelo condicional se extrajo durante la espermatogénesis en machos heterocigotos compuestos (es decir, heterocigotos para el alelo condicional y el transgén PrmCre). Los machos heterocigotos compuestos se emparejaron con hembras de tipo silvestre, y se seleccionó la descendencia resultante respecto del alelo extraído y la pérdida del transgén PrmCre. La descendencia se retrocruzó en un origen de C57B1/6 durante al menos seis generaciones. Los genotipos de ratón se confirmaron mediante PCR usando los cebadores indicados en la Figura 30B.

25

30

35

La expresión de IL-22 se examinó a nivel de ARNm y proteína en células Th de ratones de tipo silvestre e IL-22^{-/-}. Se examinó la expresión de ARNm de IL-22 en células Th1, Th2, y Th_{IL-17} de ratones de tipo silvestre ("+/+") e IL-22^{-/-} (" -/-") (Figura 30C) usando RT-PCR, confirmando que no se detectó ARNm de IL-22 en ratones IL-22^{-/-}. La expresión de IL-22, IL-17, IFN-γ, e IL-4 se examinó en células Th1, Th2, y Th_{IL-17} de ratones de tipo silvestre ("TS") e IL-22^{-/-} ("KO") usando ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 30D para cada una de IL-22, IL-17, IFN-γ, e IL-4, según se indica en la parte superior de cada gráfica, indicando las barras sólidas y huecas los niveles en ratones TS y KO, respectivamente. Además, las células T CD4 de ratones IL-22^{-/-} fueron capaces de activarse y diferenciarse a todos los subconjuntos de T colaboradoras y fueron capaces de producir niveles normales de IL-17, γ, e IL-4 en relación a células T CD4 de tipo silvestre. Como era de esperar, sin embargo, IL-22 estaba ausente en células T CD4 de IL-22^{-/-}. Se observó que los ratones IL-22^{-/-} se desarrollaban normalmente y tenían una composición y desarrollo de linfocitos similar en todos los órganos linfoides principales examinados en comparación con los ratones de tipo silvestre. (Datos no mostrados).

50

Se inyectó por vía subcutánea a los ratones IL-22^{-/-} y a los compañeros de camada de tipo silvestre en la oreja con IL-23 o PBS tal como se describe anteriormente (Ejemplo 16). En el día 16, se analizaron las orejas de los ratones mediante análisis histológico rutinario. Tal como se muestra en la Figura 31A y B, IL-23 indujo significativamente menos grosor de oreja y grosor epidérmico en ratones IL-22^{-/-} en comparación con los grupos de control. (Los ratones IL-22^{-/-} se citan en esta figura y en la Figura 32 como "KO" o "IL-22 KO"; los ratones de tipo silvestre se citan en esta figura y en la Figura 32 como "TS" o "IL-22 TS"). Mediante tinción histológica, se redujeron de manera significativa tanto la acantosis epidérmica como la inflamación dérmica en ratones IL-22^{-/-} (Fig. 31E y F, respectivamente) en comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre tratados con IL-23 (Fig. 31C y D, respectivamente). En contraste con estos resultados, la deficiencia en IL-22 no tuvo absolutamente ningún efecto en la inflamación de la piel de la oreja inducida por IL-12. (Figura 32). Por tanto, los datos demuestran que IL-22 desempeña un papel crucial en la inflamación dérmica y en la acantosis epidérmica inducida por IL-23, pero no por IL-12.

60

EJEMPLO 21: IL-23 induce la producción de IL-22 a partir de diversos linfocitos activados con IL-23

Para investigar adicionalmente la capacidad de IL-23 para inducir IL-22, se aislaron diversas poblaciones de linfocitos y se estimularon *in vitro* en las condiciones indicadas en la Figura 33. Se llevó a cabo un ELISA para detectar IL-22 en

65

los sobrenadantes de cultivo y se comunica en la Figura 33A como media \pm desviación estándar. También se examinó la capacidad de IL-23 para inducir citocinas de la familia de IL-10 distintas de IL-22. Se estimularon esplenocitos de ratones DO11.10 TCR con 0,3 mM de péptido OVA en las condiciones de polarización de células T colaboradoras durante 4 días, después se reposaron durante dos días y se volvieron a estimular con anti-CD3 unido a placa (10 μ g/ml) y anti-CD28 soluble (5 μ g/ml) durante otros 2 días. La RT-PCR se llevó a cabo en ARN aislado de células en las condiciones indicadas para cuantificar la expresión de ARNm de IL-19, IL-20 e IL-24 de ratón. También se incluyó ARN de esplenocitos normales de ratón como control. Tal como se muestra en la Figura 33B. IL-23 no indujo la expresión de cualquier otra citocina de la familia de IL-10 ensayada.

10 **EJEMPLO 22: IL-22 es una nueva citocina efectora del linaje de Th_{IL-17}**

Recientemente, se ha relacionado a IL-23 con el desarrollo de un nuevo linaje de células T CD4⁺ efectoras productoras de IL-17 (Th_{IL-17}). L. E. Harrington., Nat. Immunol. 6:1123 (2005); H. Park, Nat. Immunol. 6:1133 (2005). IL-23 es capaz de inducir a células del linaje de Th_{IL-17} a partir de células T CD4⁺ no expuestas previamente en presencia de APC y antígeno, pero es incapaz de iniciar la producción de IL-17 cuando se aplica a células T no expuestas previamente T activadas con anti-CD3/anti-CD28. L. E. Harrington et al, Nat. Immunol. 6:1123 (2005); M. Veldhoen et al., Immunity 24:179 (2006). Además, Se ha sugerido que TGF- β e IL-6 son nuevos factores para la diferenciación del subconjunto de Th_{IL-17}. M. Veldhoen et al., Immunity 24:179 (2006).

Se llevaron a cabo experimentos para probar si IL-22 puede ser una citocina de células T efectora adicional inducida por IL-23 bajo estimulación auténtica de TCR. Se activaron células T CD4⁺ de ratones transgénicos DO11.10 TCR con 0,3 μ M de péptido OVA durante 4 días con condiciones de polarización de Th1 (IL-12 y anti-IL-4), polarización de Th2 (IL-4, anti-IL-12 y anti-IFN- γ), polarización de Th_{IL-17} (IL-23, anti-IFN- γ y anti-IL-4) o Th0 (anti-IL12/23 p40, anti-IFN- γ y anti-IL-4) tal como se ha descrito anteriormente. L. E. Harrington et al., Nat Immunol 6:1123 (2005). Se extrajo ARN de las células y se efectuó la PCR en tiempo real para detectar la expresión de ARNm que codifica varias citocinas murinas (indicadas por encima de las gráficas en la Figura 34A). Además, se llevó a cabo un ELISA con los sobrenadantes de cultivo para detectar la expresión de diversas citocinas a nivel de proteína. Tal como se muestra en la Figura 34A. IL-17 se indujo por IL-23, mientras que IFN- γ e IL-4 se produjeron por células Th1 y Th2, respectivamente. Se produjo IL-22, a nivel tanto de ARNm como de proteína, a partir de células Th_{IL-17} productoras de IL-17.

Para determinar si IL-22 es una nueva citocina efectora del linaje de Th_{IL-17} completamente implicado, se dejó reposar a células T polarizadas tal como se describen anteriormente durante dos días y después se volvieron a estimular con anti-CD3 unido a placa (10 μ g/ml) y anti-CD28 soluble (5 μ g/ml) en ausencia o presencia de IL-23. Se llevó a cabo un ELISA para detectar la expresión de las citocinas murinas indicadas por encima de las gráficas en la Figura 34B. Los resultados demuestran que se produjo IL-17 específicamente a partir del subconjunto de Th_{IL-17}, incluso en ausencia de IL-23, e IL-23 potenció la producción de IL-17. IL-23 no logró promover la producción de IL-17 a partir de células Th1 y Th2 comprometidas. IL-22 mostró un patrón de expresión idéntico al de IL-17, indicando que IL-22 fue realmente una citocina efectora expresada por este nuevo subconjunto Th_{IL-17}.

Anteriormente, se había comunicado que el receptor de IL-23 se expresa en células T activadas/de memoria. C. Parham et al., J Immunol 168:5699 (2002). Los experimentos anteriores no excluyeron la posibilidad de que IL-23 actuase en células T de memoria para producir IL-22. Para abordar esto de manera más crítica, se repitieron los estudios anteriores usando células T CD4⁺ aisladas de ratones transgénicos DO11.10 TCR. Específicamente, se estimularon células T CD4⁺ de ratones transgénicos Rag2^{-/-}DO11.10 TCR con péptido OVA-células alimentadoras esplénicas pulsadas de BALB/c (irradiadas, empobrecidas para células T) durante 72 horas en condiciones de polarización de Th1 (IL-12 y anti-IL-4), condiciones de polarización de Th2 (IL-4, anti-IL-12 y anti-IFN- γ), polarización de Th_{IL-17} (IL-23, anti-IFN- γ y anti-IL-4), u otras condiciones, tal como se indica en la Fig. 35A. Tal como se muestra en esa figura, las células Th_{IL-17} produjeron los niveles más altos de IL-22, mientras que Th1 también secretaron niveles detectables de IL-22. Además, la adición de IFN- γ o IL-4 suprimió por completo la producción de IL-17; sin embargo, estas dos citocinas inhibieron solo de manera moderada la producción de IL-22 (Fig. 35A). Estos datos sugieren rutas potencialmente diferentes para la inducción de la expresión de IL-17 frente a IL-22. Sin embargo, las células Th_{IL-17} totalmente establecidas produjeron tanto IL-17 como IL-22 tras estimularlas de nuevo durante 48 horas en las condiciones secundarias indicadas (Fig. 35B). IL-23 potenció además los niveles de estas citocinas de un modo que podría no estar bloqueado por IFN- γ o IL-4 (Fig. 35B). Estos datos confirman la estabilidad de este linaje Th_{IL-17}.

Para estudiar adicionalmente si IL-17 e IL-22 se producen por las mismas células durante la activación, se estimuló a células Th_{IL-17} con PMA e ionomicina, y se usaron anticuerpos para IL-22 o IL-17 para la tinción intracelular. Tal como se muestra en la Figura 35C, las células productoras de IL-17 se observaron principalmente desde el eje de Th_{IL-17} (panel izquierdo). También se detectaron células productoras de IL-22 a partir del linaje de Th_{IL-17} (panel derecho). La tinción conjunta tanto para IL-22 como para IL-17 reveló que una parte sustancial de las células del linaje de Th_{IL-17} producían tanto IL-22 como IL-17 de manera simultánea, lo que indica que IL-22 e IL-17 se producen a partir de las mismas células.

Como ya se ha discutido anteriormente, los estudios recientes también sugieren que otros factores de APC pueden ser la fuerza impulsora detrás de la diferenciación de células T productoras de IL-17 a partir de células T CD4⁺ no

expuestas previamente, ya que IL-23 no logró inducir de nuevo la producción de IL-17 a partir de células T CD4 no expuestas previamente purificadas. M. Veldhoen et al., *Immunity* 24:179 (2006). Dos de los factores críticos para la producción de IL-17 a partir de células T CD4 no expuestas previamente se han identificado como TGF- β e IL-6. Id. Para determinar si estos factores también eran críticos para la producción de IL-22 en ratones, se estimuló a células T CD4 (> 98 %) con anti-CD3 unido a placa (10 μ g/ml) y anti-CD28 soluble (5 μ g/ml). De manera coherente con los datos publicados, TGF- β e IL-6, más que IL-23, indujeron la producción de IL-17 (Fig. 36A, panel derecho). De manera sorprendente, en contraste con la inducción de IL-17, IL-22 seguía induciéndose solo en presencia de IL-23 y no pudo inducirse por TGF- β e IL-6 (Figura 36A, panel izquierdo). Estos datos sugieren que la transcripción de IL-17 e IL-22 puede estar regulada de manera distinta. Sin embargo, tal como se ha comunicado previamente, TGF- β e IL-6 pueden no establecer un linaje de células T productor de IL-17 a largo plazo sin IL-23 (Fig. 36B). Los datos demuestran, por lo tanto, que IL-23 puede ser uno de los factores principales que dirigen al subconjunto de células T productor de IL-22.

A continuación se examinó si podía establecerse un linaje de células T productor de IL-22 similar a partir de células T CD4. Se descubrió que IL-23 puede inducir la secreción de IL-22 a partir de células T CD4+ humanas no expuestas previamente estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 en condiciones de polarización de Th_{IL-17} (Fig. 36C, panel izquierdo). Estas células pudieron producir IL-22 tras volver a estimularlas mediante la adición nuevamente de IL-23 (Fig. 36C, panel derecho), lo que indica la formación de un linaje de células T estable. Aunque estas células se cultivaron en condiciones similares a las de los estudios murinos anteriores, no se pudo detectar la producción de IL-17 por encima del límite del ensayo (datos no mostrados).

En conclusión, los datos determinan por primera vez que IL-23 puede inducir a un subconjunto de células T productoras de IL-22 a partir de células T CD4 no expuestas previamente tanto murinas como humanas. La producción de IL-17 por este linaje depende de otros factores ambientales. Mientras que en condiciones estimulantes auténticas de antígeno y APC IL-23 dirigió al subconjunto de células T a la producción de IL-22 e IL-17. IL-23 también estimuló la producción de IL-22 cuando se activaron células T no expuestas previamente con anti-CD3 y anti-CD28. TGF- β e IL-6, que pueden inducir la expresión transitoria de IL-17 a partir de células T no expuestas previamente pero no un compromiso de linaje a largo plazo, no lograron dirigir la producción de IL-22.

EJEMPLO 23: IL-19, IL-20, e IL-24 también inducen el engrosamiento epidérmico

IL-22 pertenece a una familia de citocinas que incluye a IL-19, IL-20, e IL-24, todas las cuales muestran expresión elevada en la piel psoriásica. También se ensayó estas citocinas para determinar si estas, al igual que IL-22, son capaces de inducir hiperplasia epidérmica y acantosis. Se cultivó EHR durante cuatro días y se trató con IL-19, IL20, IL-22, o IL-24 a 20 ng/ml o EGF a 6 ng/ml. La EHR tratada se tiñó con H&E. Los resultados se muestran en la Figura 37A. Todas las citocinas indujeron acantosis de la epidermis nucleada viable, tal como se indicó por el aumento de longitud de las flechas de doble punta. De manera coherente con observaciones previas (véase más arriba), IL-22 indujo hipogranulosis, o una disminución en la capa de células granulares (puntas de flecha), así como la hialinización del estrato córneo inferior (asteriscos). IL-22 también indujo paraqueratosis en EHR cultivada durante 7 días (datos no mostrados). La hipogranulosis y la paraqueratosis son características histológicas observadas frecuentemente en la psoriasis. IL-19, IL-22, e IL-24 indujeron únicamente acantosis epidérmica con poco o ningún efecto evidente en la capa de células granulares o en el estrato córneo. EGF indujo acantosis epidérmica con hipergranulosis y compactación de los queratinocitos en el estrato granuloso (flechas). El engrosamiento epidérmico inducido por IL-19, IL20, IL-22, o IL-24 se cuantificó en un experimento independiente y se representa gráficamente en la Figura 38. IL-22 tuvo el efecto mayor. Las citocinas inflamatorias TNF- α , IFN- γ , e IL-1 β , que se cree que desempeñan un papel en la psoriasis, no estimularon la proliferación de queratinocitos en este sistema de EHR (datos no mostrados). Por lo tanto, estas citocinas pueden desempeñar un papel secundario en la psoriasis o pueden desempeñar un papel a través de una ruta independiente de IL-19, IL-20, IL-22, y/o IL-24.

Se usó inmunohistoquímica para detectar a la citoqueratina 16 (CK16), un marcador de hiperplasia epidérmica. IL-24, IL-22, y EGF indujeron la expresión de CK16 por toda la epidermis no confinada, mientras que IL-19 e IL-20 solo indujeron la expresión de CK16 en la zona basal. (Figura 37B).

También se usó inmunohistoquímica para detectar psoriasina (S100A7), una de varias proteínas de la familia S100 reguladas positivamente en determinadas afecciones cutáneas hiperproliferativas e inflamatorias, incluyendo psoriasis. IL-19, IL-20, IL-22, e IL-24 indujeron la expresión de S100A7 en la epidermis suprabasal, teniendo IL-22 e IL-24 los mayores efectos. (Figura 37C). Se observó la tinción de S100A7 en los núcleos y los citoplasmas de los queratinocitos, apareciendo parte de la proteína también como extracelular. Los resultados mostrados en las Figuras 37B y C se cuantificaron y se muestran gráficamente en la Figura 37E y F.

También se usó inmunohistoquímica para detectar pY(705)-STAT3, la forma transactivante de STAT3. Se ha demostrado que STAT3 está elevada en la piel de lesiones psoriásicas. IL-19, IL-20, IL-22, e IL-24 indujeron una activación persistente de STAT3 en queratinocitos de EHR encontrados en todas las capas celulares viables, demostrada por su localización nuclear. (Figura 37D).

EJEMPLO 24: Los anticuerpos bloqueantes para receptores para IL-20 e IL-22 reducen la expresión de psoriasina

Tanto IL-19 como IL-20 señalizan a través de un heterodímero receptor de IL-20Ra e IL-20Rb. IL-20 también señala a través de un heterodímero receptor de IL-22R e IL-20Rb. IL-22 señala a través de un heterodímero de IL-22R e IL-10R2. La expresión en la superficie celular de estos componentes receptores en queratinocitos aislados a partir de EHR o de cultivos primarios de queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK, de prepucio neonatal donado) se examinó mediante citometría de flujo. Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales para citometría de flujo: anti-IL-20Ra (generado en ratones para fines del presente estudio); anti-IL-20Rb (generado en ratones para fines del presente estudio); anticuerpo anti-IL-22R 7E9 (descrito anteriormente); y FAB874P anti-IL-10R2 (conjugado a PE) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados se muestran en la Figura 39. El componente receptor al que se une cada anticuerpo se muestra en la parte superior derecha de cada gráfica (IL-22R se describe como "IL-22R1"). IL-20Rb e IL-10R2 se expresaron de manera consistente en la superficie de NHEK, independientemente de la confluencia, número de pase o niveles de calcio en el medio. (Figura 39A). Por el contrario, la expresión en la superficie celular tanto de IL-20Ra como de IL-22R1 en NHEK varió de un donante a otro, y se encontraba de manera consistente a un nivel relativamente bajo aunque detectable. (Figura 39A y datos no mostrados). En comparación con los niveles de expresión en monocapas de NHEK, IL-20Ra e IL-22R se expresaron a niveles mucho mayores en queratinocitos aislados a partir de EHR (Figura 39B). Los motivos para esta diferencia son desconocidos. Sin embargo, queda igualmente claro que todos los componentes de receptor analizados se expresan en queratinocitos humanos. La expresión de estos componentes de receptor en células inmunitarias (células T, células B, linfocitos citotóxicos naturales, y monocitos) no se detectó. (Datos no mostrados.) Por lo tanto, los ligandos para estos componentes de receptor proporcionan probablemente una relación entre el sistema inmunitario y anomalías en queratinocitos.

Para examinar si los anticuerpos anteriores pueden bloquear los efectos del tratamiento con IL-19, IL-20, e IL-22, tal como se describe en el Ejemplo anterior, se añadieron 20 microgramos/ml de anti-IL20Ra, anti-IL20Rb, o anti-IL-22R al medio de cultivo de EHR una hora antes de la adición de 20 ng/ml de IL-19, IL-20, o IL-22. La EHR se cultivó entonces durante cuatro días, cambiando el medio al segundo día (4,5 ml de medio fresco incluyendo citocina y anticuerpo). Entonces se tiñó la EHR mediante inmunohistoquímica para psoriasisina (S100A7). Los resultados se muestran en la Figura 40. Las EHR tratadas con IL-19, IL-20 e IL-22 se muestran en la primera, segunda, y tercera fila, respectivamente. Las EHR pretratadas con anti-IL-20Ra (aIL-20Ra), anti-IL-20Rb (aIL-20Rb), o anti-IL-22R (aIL-22R1) se muestran en la tercera, cuarta, y quinta columna, respectivamente. No se muestran controles de anticuerpo y anticuerpos de control de isotipo en las columnas primera y segunda.

Los resultados demuestran que anti-IL-20Ra o anti-IL-20Rb bloquearon de manera eficaz la expresión de psoriasisina inducida por IL-19. De manera similar, anti-IL-22R bloqueó de manera eficaz la expresión de psoriasisina inducida por IL-22. Anti-IL-20Rb bloqueó de manera eficaz la expresión de psoriasisina inducida por IL-20, pero anti-IL20Ra no. De manera similar, anti-IL-22R fue incapaz de bloquear la expresión de psoriasisina inducida por IL-20.

Para investigar adicionalmente los efectos de anti-IL-22R y anti-IL20Ra en la expresión de psoriasisina inducida por IL-20, se trató previamente a las EHR con dichos anticuerpos bien solos o en combinación antes del tratamiento con IL-20. Los resultados se muestran en la Figura 41. Tal como se ha descrito anteriormente, bien anti-IL-22R o bien anti-IL-20Ra solo fue incapaz de bloquear la expresión de psoriasisina inducida por IL-20 (segunda columna, ambos paneles). Sin embargo, la combinación de anti-IL-20Ra y anti-IL-22R bloqueó de manera eficaz la expresión de psoriasisina inducida por IL-20, lo que sugiere que IL-20Ra e IL-22R tienen papeles complementarios en la señalización de IL-20 en queratinocitos humanos (panel inferior izquierdo).

EJEMPLO 25: IL-19, IL-20, IL-22, e IL-24 inducen perfiles de expresión génica similares

Para identificar genes inducidos por IL-19, IL-20, IL-22, e IL-24, se trató a las EHR con 20 ng/ml de IL-19, IL-20, IL-22, o IL-24 durante cuatro días. Se preparó ARN, y se hibridó ADNc a microplacas génicas Affymetrix U133 Plus (Affymetrix, Santa Clara, CA) que contienen 54.675 conjuntos de sondas. Los datos se analizaron respecto de genes cuya expresión estaba aumentada en al menos el doble. IL-20, IL-22, e IL-24 mostraron perfiles de expresión génica similares. De los principales 20 genes inducidos comúnmente por IL-20, IL-22, e IL-24, siete fueron genes que se había comunicado anteriormente que estaban asociados con la psoriasis. Estos genes son psoriasisina (S100A7), S100A12, SCCA2, SERPINB4, CCL20, CD36, e Stat3.

Para examinar si los genes inducidos por IL-20, IL-22, e IL-24 muestran regulación positiva en la psoriasis, se compararon los análisis de micromatriz descritos anteriormente con un estudio de micromatriz anterior de piel psoriásica (Zhou et al., (2003) *Physiol. Genomics* 13:69-78). Debido a que este estudio se efectuó usando una placa para micromatriz diferente, solo se compararon las referencias de secuencias comunes entre ese estudio y el presente estudio. De las 468 referencias de secuencia que se regularon positivamente en la piel psoriásica, 356 estaban inducidas por IL-20, IL-22, e IL-24, y 188 de estas lo estaban de manera significativa ($p < 0,05$). En su conjunto, los estudios anteriores demuestran un solapamiento sustancial entre genes que están inducidos por IL-20, IL-22, e IL-24 y genes que están regulados positivamente en la piel psoriásica.

EJEMPLO 26: Depósito de materiales

La siguiente línea celular de hibridoma se ha depositado en la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA (ATCC):

Denominación hibridoma/anticuerpo	de N° ATCC	Fecha de depósito
Anti-IL-22 (3F11.3)	PTA-7312	13 de enero de 2006
Anti-IL-22 (11H4.4)	PTA-7315	13 de enero de 2006
Anti-IL-22 (8E11.9)	PTA-7319	13 de enero de 2006
Anti-IL-22R (7E9.10.8)	PTA-7313	13 de enero de 2006
Anti-IL-22R (8A12.32)	PTA-7318	13 de enero de 2006
Anti-IL-22R (8H11.32.28)	PTA-7317	13 de enero de 2006

5 Este depósito se efectuó bajo las provisiones del Tratado de Budapest acerca del Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el Propósito del Procedimiento de Patentes y las Regulaciones de este (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable durante 30 años a partir de la fecha de depósito. La línea celular se hará disponible por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sometida a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que asegura (a) que el acceso al cultivo estará disponible durante el periodo pendiente de la solicitud de patente a aquellos determinados por el Comisionado como habilitados para esto de acuerdo con 37 CFR §1.14 y 35 USC §122, y (b) que todas las restricciones respecto de la disponibilidad al público del cultivo depositado de este modo se eliminen de manera irrevocable tras la concesión de la patente.

15 El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo en que si el cultivo depositado muriera, se perdiera o se destruyera estando cultivado en condiciones adecuadas, se reemplazará a la mayor brevedad, tras la notificación, con un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de la línea celular depositada no debe considerarse una autorización para poner en práctica la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes relativas a patentes.

20 La anterior memoria descriptiva escrita se considera suficiente para permitir a un experto en la materia poner en práctica la invención. La presente invención no debe considerarse limitada en su alcance por el material depositado, ya que la realización depositada se considera una sola ilustración de determinados aspectos de la invención y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente se encuentra dentro del alcance de la presente invención. El depósito de material en el presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento sea inadecuada para permitir la puesta en práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni tampoco debe considerarse que el alcance de las reivindicaciones esté limitado a ilustraciones específicas que representa. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción precedente.

30 Los siguientes párrafos numerados (párr.) contienen afirmaciones adicionales referentes a diversos aspectos de la presente invención:

35 1. Un anticuerpo que se une específicamente a IL-22, siendo el anticuerpo

(a) un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado entre el hibridoma 3F11.3 (Número de Referencia ATCC PTA-7312), el hibridoma 11H4.4 (N° de Referencia ATCC PTA-7315), y el hibridoma 8E11.9 (N° de Referencia ATCC PTA-7319);

(b) una forma madurada por afinidad del anticuerpo de (a);

(c) un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de (a) o (b); o

(d) una forma humanizada del anticuerpo de (a), (b), o (c).

45 2. Un anticuerpo que se une específicamente a IL-22R, siendo el anticuerpo

(a) un anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado entre 7E9 (Número de Referencia ATCC PTA-7313), el hibridoma 8A12 (N° de Referencia ATCC PTA-7318), y el hibridoma 8H11 (N° de Referencia ATCC PTA-7317);

(b) una forma madurada por afinidad del anticuerpo de (a);

(c) un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de (a) o (b); o

(d) una forma humanizada del anticuerpo de (a), (b), o (c).

50 3. Un método para tratar un trastorno autoinmunitario, en el que el trastorno autoinmunitario no es artritis, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-22.

55 4. El método del párr. 3, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22.

5. El método del párr. 4, en el que el anticuerpo que se une específicamente a IL-22 es un anticuerpo de acuerdo con el párr. 1.
- 5 6. El método del párr. 3, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22R.
7. El método del párr. 6, en el que el anticuerpo que se une específicamente a IL-22R es un anticuerpo de acuerdo con el párr. 2.
- 10 8. El método del párr. 3, en el que el antagonista de IL-22 es IL-22BP.
9. El método del párr. 3, en el que el trastorno autoinmunitario es enfermedad inflamatoria del intestino.
- 15 10. El método del párr. 3, en el que el trastorno autoinmunitario es psoriasis.
11. El método del párr. 10, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22.
12. El método del párr. 11, que comprende además administrar al menos un anticuerpo seleccionado entre un anticuerpo que se une específicamente a IL-20Ra, un anticuerpo que se une específicamente a IL-20Rb, y un anticuerpo que se une específicamente a IL-22R.
- 20 13. El método del párr. 10, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22R.
14. El método del párr. 13, que comprende además administrar al menos un anticuerpo seleccionado entre un anticuerpo que se une específicamente a IL-22, un anticuerpo que se une específicamente a IL-20Ra, y un anticuerpo que se une específicamente a IL-20Rb.
- 25 15. Un método para tratar la inflamación, en el que la inflamación no es inflamación artrítica, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-22.
- 30 16. El método del párr. 15, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22.
17. El método del párr. 16, en el que el anticuerpo que se une específicamente a IL-22 es un anticuerpo de acuerdo con el párr. 1.
- 35 18. El método del párr. 15, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22R.
19. El método del párr. 18, en el que el anticuerpo que se une específicamente a IL-22R es un anticuerpo de acuerdo con el párr. 2.
- 40 20. El método del párr. 15, en el que el antagonista de IL-22 es IL-22BP.
21. El método del párr. 15, en el que la inflamación es una inflamación autoinmunitaria.
- 45 22. El método del párr. 15, en el que la inflamación es inflamación de la piel.
23. El método del párr. 15, en el que la inflamación es inflamación crónica.
- 50 24. Un método para inhibir la progresión tumoral, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-22.
25. El método del párr. 24, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22.
- 55 26. El método del párr. 25, en el que el anticuerpo que se une específicamente a IL-22 es un anticuerpo de acuerdo con el párr. 1.
27. El método del párr. 25, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22R.
- 60 28. El método del párr. 27, en el que el anticuerpo que se une específicamente a IL-22R es un anticuerpo de acuerdo con el párr. 2.
29. El método del párr. 24, en el que el antagonista de IL-22 es IL-22BP.
- 65 30. Un método para estimular una ruta de señalización mediada por IL-23 en un sistema biológico, comprendiendo el método proporcionar un agonista de IL-22 al sistema biológico.

31. El método del párr. 30, en el que el agonista de IL-22 es IL-22.
- 5 32. Un método para inhibir una ruta de señalización mediada por IL-23 en un sistema biológico, comprendiendo el método proporcionar un antagonista de IL-22 al sistema biológico.
33. El método del párr. 32, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22.
- 10 34. El método del párr. 32, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22R.
35. Un método para estimular una función celular de Th_{IL-17}, comprendiendo el método exponer a una célula Th_{IL-17} a un agonista de IL-22.
- 15 36. El método del párr. 35, en el que el agonista de IL-22 es IL-22.
37. Un método para inhibir una función celular de Th_{IL-17}, comprendiendo el método exponer a una célula Th_{IL-17} a un antagonista de IL-22.
- 20 38. El método del párr. 37, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22.
39. El método del párr. 37, en el que el antagonista de IL-22 es un anticuerpo que se une específicamente a IL-22R.
- <110> GENENTECH, INC.
- 25 <120> TÍTULO DE LA INVENCIÓN: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES Y TRASTORNOS ASOCIADOS CON LA SEÑALIZACIÓN DE CITOCINAS
- <130> LCW/FP6876437
- 30 <140> 13150883.0
<141> 30-11-2006
- <150> 06851192.2
<151> 30-11-2006
- 35 <150> PCT/US2006/061418
<151> 30-11-2006
- <150> US 60/741.640
<151> 02-12-2005
- 40 <150> US 60/822.597
<151> 16-08-2006
- 45 <160> 4
- <210> SEC ID Nº 1
<211> LONGITUD: 1152
<212> TIPO: ADN
- 50 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*
- <400> SECUENCIA: 1

```

cttcagaaca ggttctcctt ccccagtcac cagttgctcg agttagaatt 50
gtctgcaatg gccgccctgc agaaatctgt gagctcttcc cttatgggga 100
ccctggccac cagctgcctc cttctcttgg ccctcttggg acagggagga 150
gcagctgcgc ccacagctc ccactgcagg cttgacaagt ccaacttcoa 200
gcagccctat atcaccaacc gcaccttcac gctggctaag gaggctaget 250
tggctgataa caacacagac gttcgtctca ttggggagaa actgttccac 300
ggagtcaagta tgagtgagcg ctgctatctg atgaagcagg tgctgaactt 350
cacccttgaa gaagtgtgtt tccctcaatc tgatagggtc cagccttata 400
tgcaggaggt ggtgcccttc ctggccagge tcagcaacag gctaagcaca 450
tgtcatattg aaggtgatga cctgcatatc cagaggaatg tgcaaaagct 500
gaaggacaca gtgaaaaagc ttggagagag tggagagatc aaagcaattg 550
gagaatgga tttgtgttt atgtctctga gaaatgctg catttgacca 600
gagcaaaagc gaaaaatgaa taactaacc cctttccctg ctagaataa 650
caattagatg ccccaaagcg atttttttta accaaaagga agatgggaag 700
ccaaactcoa tcatgatggg tggattccaa atgaaccctc gcgtaggta 750
caaaggaaac caatgccact tttgtttata agaccagaag gtagacttcc 800
taagcataga tatttattga taacatttca ttgtaactgg tgttctatac 850
acagaaaaca atttattttt taataattg tctttttcca taaaaaagat 900
tactttccat tcctttaggg gaaaaaaccc ctaaatagct tcatgtttcc 950
ataatcagta ctttatattt ataattgtat ttattattat tataagactg 1000
cattttattt atatcatttt attaatatgg atttatttat agaaacatca 1050
ttcगतattg ctacttgagt gtaaggctaa tattgatatt tatgacaata 1100
attatagagc tataacatgt ttatttgacc tcaataaaca cttggatata 1150
cc 1152
    
```

<210> SEC ID Nº 2
 <211> LONGITUD: 179
 5 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*
 <400> SECUENCIA: 2

```

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr
 1          5          10
Leu Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly
          20          25          30

Gly Ala Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser
          35          40          45
Asn Phe Gln Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala
          50          55          60
Lys Glu Ala Ser Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile
          65          70          75
Gly Glu Lys Leu Phe His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr
          80          85          90
Leu Met Lys Gln Val Leu Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe
          95          100          105
Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro
          110          115          120
Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg Leu Ser Thr Cys His Ile Glu
          125          130          135
Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp
          140          145          150
Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile Lys Ala Ile Gly
          155          160          165
Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys Ile
          170          175
    
```

<210> SEC ID Nº 3
 <211> LONGITUD: 574
 15 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<400> SECUENCIA: 3

Met	Arg	Thr	Leu	Leu	Thr	Ile	Leu	Thr	Val	Gly	Ser	Leu	Ala	Ala
1				5					10					15
His	Ala	Pro	Glu	Asp	Pro	Ser	Asp	Leu	Leu	Gln	His	Val	Lys	Phe
				20					25					30
Gln	Ser	Ser	Asn	Phe	Glu	Asn	Ile	Leu	Thr	Trp	Asp	Ser	Gly	Pro
				35					40					45
Glu	Gly	Thr	Pro	Asp	Thr	Val	Tyr	Ser	Ile	Glu	Tyr	Lys	Thr	Tyr
				50					55					60
Gly	Glu	Arg	Asp	Trp	Val	Ala	Lys	Lys	Gly	Cys	Gln	Arg	Ile	Thr
				65					70					75
Arg	Lys	Ser	Cys	Asn	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu
				80					85					90
Leu	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Val	Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Ser
				95					100					105
Ala	Thr	Lys	Met	Thr	Asp	Arg	Phe	Ser	Ser	Leu	Gln	His	Thr	Thr
				110					115					120
Leu	Lys	Pro	Pro	Asp	Val	Thr	Cys	Ile	Ser	Lys	Val	Arg	Ser	Ile
				125					130					135
Gln	Met	Ile	Val	His	Pro	Thr	Pro	Thr	Pro	Ile	Arg	Ala	Gly	Asp
				140					145					150
Gly	His	Arg	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Ile	Phe	His	Asp	Leu	Phe	Tyr
				155					160					165
His	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Gln	Met	His	Leu	Gly
				170					175					180
Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Thr
				185					190					195
Glu	Phe	Leu	Gly	Thr	Ile	Met	Ile	Cys	Val	Pro	Thr	Trp	Ala	Lys
				200					205					210
Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Met	Cys	Arg	Val	Lys	Thr	Leu	Pro	Asp	Arg
				215					220					225
Thr	Trp	Thr	Tyr	Ser	Phe	Ser	Gly	Ala	Phe	Leu	Phe	Ser	Met	Gly
				230					235					240
Phe	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Val	Thr
				245					250					255
Lys	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Asn	Ser	Leu	Asn	Val	Gln	Arg	Val	Leu
				260					265					270
Thr	Phe	Gln	Pro	Leu	Arg	Phe	Ile	Gln	Glu	His	Val	Leu	Ile	Pro

				275					280				285
Val	Phe	Asp	Leu	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Gln	Pro	Val
				290					295				300
Tyr	Ser	Gln	Ile	Arg	Val	Ser	Gly	Pro	Arg	Glu	Pro	Ala	Gly
				305					310				315
Pro	Gln	Arg	His	Ser	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Tyr	Leu	Gly	Gln
				320					325				330
Asp	Ile	Ser	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Asn	Val	Pro	Pro	Pro	Gln
				335					340				345
Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Tyr	Ala	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Glu	Val
				350					355				360
Pro	Pro	Ser	Tyr	Ala	Pro	Gln	Val	Thr	Pro	Glu	Ala	Gln	Phe
				365					370				375
Phe	Tyr	Ala	Pro	Gln	Ala	Ile	Ser	Lys	Val	Gln	Pro	Ser	Ser
				380					385				390
Ala	Pro	Gln	Ala	Thr	Pro	Asp	Ser	Trp	Pro	Pro	Ser	Tyr	Gly
				395					400				405
Cys	Met	Glu	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Thr	Leu
				410					415				420
Ser	Pro	Lys	His	Leu	Arg	Pro	Lys	Gly	Gln	Leu	Gln	Lys	Glu
				425					430				435
Pro	Ala	Gly	Ser	Cys	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu
				440					445				450
Thr	Ser	Leu	Ala	Met	Glu	Glu	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu
				455					460				465
Gln	Pro	Leu	Gly	Ile	Cys	Thr	Asp	Arg	Thr	Ser	Asp	Pro	Asn
				470					475				480
Leu	His	Ser	Gly	Glu	Glu	Gly	Thr	Pro	Gln	Tyr	Leu	Lys	Gly
				485					490				495
Leu	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Gln	Ile	Glu	Gly	His	Pro	Met
				500					505				510
Leu	Pro	Leu	Gln	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	Cys	Ser	Pro	Ser	Asp
				515					520				525
Gly	Pro	Ser	Pro	Trp	Gly	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Val	Cys	Pro
				530					535				540
Asp	Glu	Ala	Lys	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Thr	Ser	Asp	Leu	Glu
				545					550				555
Pro	Thr	Glu	Leu	Asp	Ser	Leu	Phe	Arg	Gly	Leu	Ala	Leu	Thr
				560					565				570
Gln	Trp	Glu	Ser										

<210> SEC ID Nº 4
 <211> LONGITUD: 263
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*
 <400> SECUENCIA: 4

5

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

125 130 135
 Arg Ala Ala Ser Ala Gly Ser Tyr Ser Glu Trp Ser Met Thr Pro
 140 145 150
 Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Ile Asp Pro Pro Val Met
 155 160 165
 Asn Ile Thr Gln Val Asn Gly Ser Leu Leu Val Ile Leu His Ala
 170 175 180
 Pro Asn Leu Pro Tyr Arg Tyr Gln Lys Glu Lys Asn Val Ser Ile
 185 190 195
 Glu Asp Tyr Tyr Glu Leu Leu Tyr Arg Val Phe Ile Ile Asn Asn
 200 205 210
 Ser Leu Glu Lys Glu Gln Lys Val Tyr Glu Gly Ala His Arg Ala
 215 220 225
 Val Glu Ile Glu Ala Leu Thr Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val
 230 235 240
 Ala Glu Ile Tyr Gln Pro Met Leu Asp Arg Arg Ser Gln Arg Ser
 245 250 255
 Glu Glu Arg Cys Val Glu Ile Pro
 260

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a IL-22, siendo el anticuerpo:
 - 5 (a) un anticuerpo producido a partir de un hibridoma seleccionado entre 8E11.9 (Nº de Referencia ATCC PTA-7319) y 3F11.3 (Nº de Referencia ATCC PTA-7312);
 - (b) una forma madurada por afinidad del anticuerpo de (a);
 - (c) un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de (a) o (b); o
 - 10 (d) una forma humanizada del anticuerpo de (a), (b), o (c).
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a IL-22 humana.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a IL-22 murina.
- 15 4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a IL-22 humana e IL-22 murina.
5. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo se une a IL-22 intracelular.
- 20 6. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo se une a IL-22 humana con una KD de ≤ 1 nM.
7. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1(a), donde el anticuerpo producido por un hibridoma seleccionado entre 8E11.9 (Nº de Referencia ATCC PTA-7319) se une a IL-22 humana con una KD de 0,72 nM.
- 25 8. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo se une a un marcador detectable.
9. Una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 10. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en un método para detectar IL-22.
11. El anticuerpo o la composición de acuerdo con la reivindicación 10, donde la IL-22 es intracelular.
- 35 12. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en un método para diagnosticar un trastorno inflamatorio o un trastorno autoinmunitario.
13. Un método para detectar la expresión de un gen que codifica IL-22 en una muestra de ensayo, que comprende poner en contacto un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con la muestra de ensayo y detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo e IL-22 en la muestra de ensayo.
- 40 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde la IL-22 es intracelular.
- 45 15. Un kit que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 e instrucciones para usar el anticuerpo para detectar IL-22.

FIGURA 1

CTTCAGAACAGGTTCTCCTTCCCCAGTCACCAGTTGCTCGAGTTAGAATTGCTGCAATG
GCCGCCCTGCAGAAATCTGTGAGCTCTTTCCTTATGGGGACCCCTGGCCACCAGCTGCCTC
CTTCTCTTGGECCTCTTGGTACAGGGAGGAGCAGCTGCGCCCATCAGCTCCCAGTGCAGG
CTTGACAAGTCCAACCTCCAGCAGCCCTATATCACCAACCGCACCTTCATGCTGGCTAAG
GAGGCTAGCTTGGCTGATAACAACACAGACGTTTCGTCTCATTGGGGAGAACTGTTCCAC
GGAGTCAGTATGAGTGAGCGCTGCTATCTGATGAAGCAGGTGCTGAACTTCACCCCTGAA
GAAGTGCTGTTCCCTCAATCTGATAGGTTCCAGCCTTATATGCAGGAGGTGGTGCCCTTC
CTGGCCAGGCTCAGCAACAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGATGACCTGCATATC
CAGAGGAATGTGCAAAGCTGAAGGACACAGTGAAAAGCTTGGAGAGAGTGGAGAGATC
AAAGCAATTGGAGAACTGGATTTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCCTGCATTGACCA
GAGCAAAGCTGAAAATGAATAACTAACCCCTTTCCTGCTAGAAATAACAATTAGATG
CCCCAAAGCGATTTTTTTTAAACCAAAGGAAGATGGGAAGCCAACTCCATCATGATGGG
TGGATTCCAAATGAACCCCTGCGTTAGTTACAAAGGAAACCAATGCCACTTTTGTTTATA
AGACCAGAAGGTAGACTTTCCTAAGCATAGATATTTATTGATAACATTTCAATTGTAACCTGG
TGTTCTATACA CAGAAAACAATTTATTTTTTAAATAATTGCTTTTTTCCATAAAAAAGAT
TACTTTCATTCTTTAGGGGAAAAAACCCCTAATAGCTTCATGTTTCCATAATCAGTA
CTTTATATTTATAAATGTATTTATTATTATTATAAGACTGCATTTTATTTATATCATTTT
ATTAATATGGATTTATTTATAGAAACATCATTCGATATTGCTACTTGAGTGTAAGGCTAA
TATTGATATTTATGACAATAATTATAGAGCTATAACATGTTTATTTGACCTCAATAAACA
CTTGGATATCCC

FIGURA 2

MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAPISSHCRDKSNFQOPYITNRTFMLAKEASLADNNTDV
RLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVVFRLARLSNRLSTCHIEGDBLHIORN
VQKLDITVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACT

Péptido señal: aminoácidos 1-33

FIGURA 3

MRTLLTILTVGSLAAHAPEDPSDLLQHVKFQSSNFENILTWDSGPEGTPDTVYSIEYKTY
GERDWVAKKGCQRITRKSCNLTVETGNLTLEYARVTAVSAGGRSATKMTDRFSSLOHTT
LKPPDVTCISKVRSIQMIVHPTPTPIRAGDGHRLTLEDIFHDLFYHLELQVNRTYQMHLG
GKQREYBFFGLTPDTEFLGTIMICVPTWAKESAPYMCRVKTLPDRTWTYSFSGAFLFSMG
FLVAVLCYLSYRYVTKPPAPPNSLVQRVLTFOPLRFIQEHVLI PVFDLSGSPSSLAQPVG
YSQIRVSGPREPAGAPQRHSLSEITYLGQPDISILQPSNVPPPQILSPLSYAPNAAPEVG
PPSYAPQVTPEAQFFFYAPQAI SKVQPSYAPQATPDSWPPSYGYCMESGSKDSPTGTL
SPKHLRFPKGQLQKEPPAGSCMLGGLSLOEVTSLAMEESQEAKSLHQPLGICTDRTSDPNV
LHSGEETFOYLKQQLPLLSSVQIEGHPSLPLQPPSGPCSPSDQGPSWGLLESVLCRK
DEAKSPAPETSDLEQPTELDSLFRGLALTVQWES

Dominio de fibronectina de tipo III: aminoácidos 18-155

FIGURA 4

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNIQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIMFSCSM
KSSHQKPSGCWQHISCNFGCRTLAKYGORQWKNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYS
EWSMTPRFTPWETKIDPPVNIQVNGSLLVILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQ
KVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIQPMLDRRSORSEERCVEIP

Dominios de fibronectina de tipo III: aminoácidos 26-68,100-161 y 162-263

FIGURA 5

Generación de anticuerpos anti-IL-22

Clon	IC para hiL-22	IC para mL-22	hiL-22 de bloqueo	mIL-22 de bloqueo	Isotipo
1A7			**		
1F6			**		
3F11	****	****	*****	*****	IgG2a
6F11			**	**	
6G7			****	**	
7E2			***	***	
8E11	****	****	*****	*****	IgG1
10E4			**		
11H4			*****	*****	IgG1
14B7		****	*	*	IgG2a
14B9	***	****			IgG2a
15A4	****	****	**		IgG2b
15E4	****	****	***	*	IgG2b
19G5				***	
20E5	***	***			IgG2b

IC: tinción de citocinas intracelular

FIGURA 6

Bloqueo de la señalización de IL-22 humana mediante anticuerpos anti-hIL-22

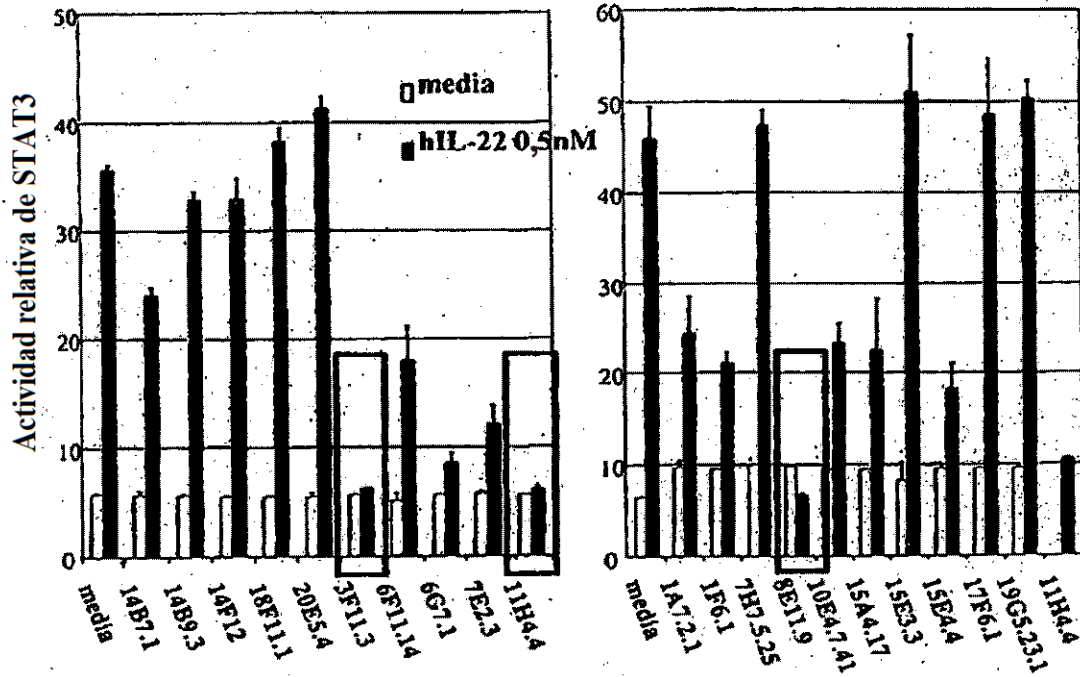


FIGURA 7

Curva de dosis de 11F4, 3F11 y 8E11 en hIL-22

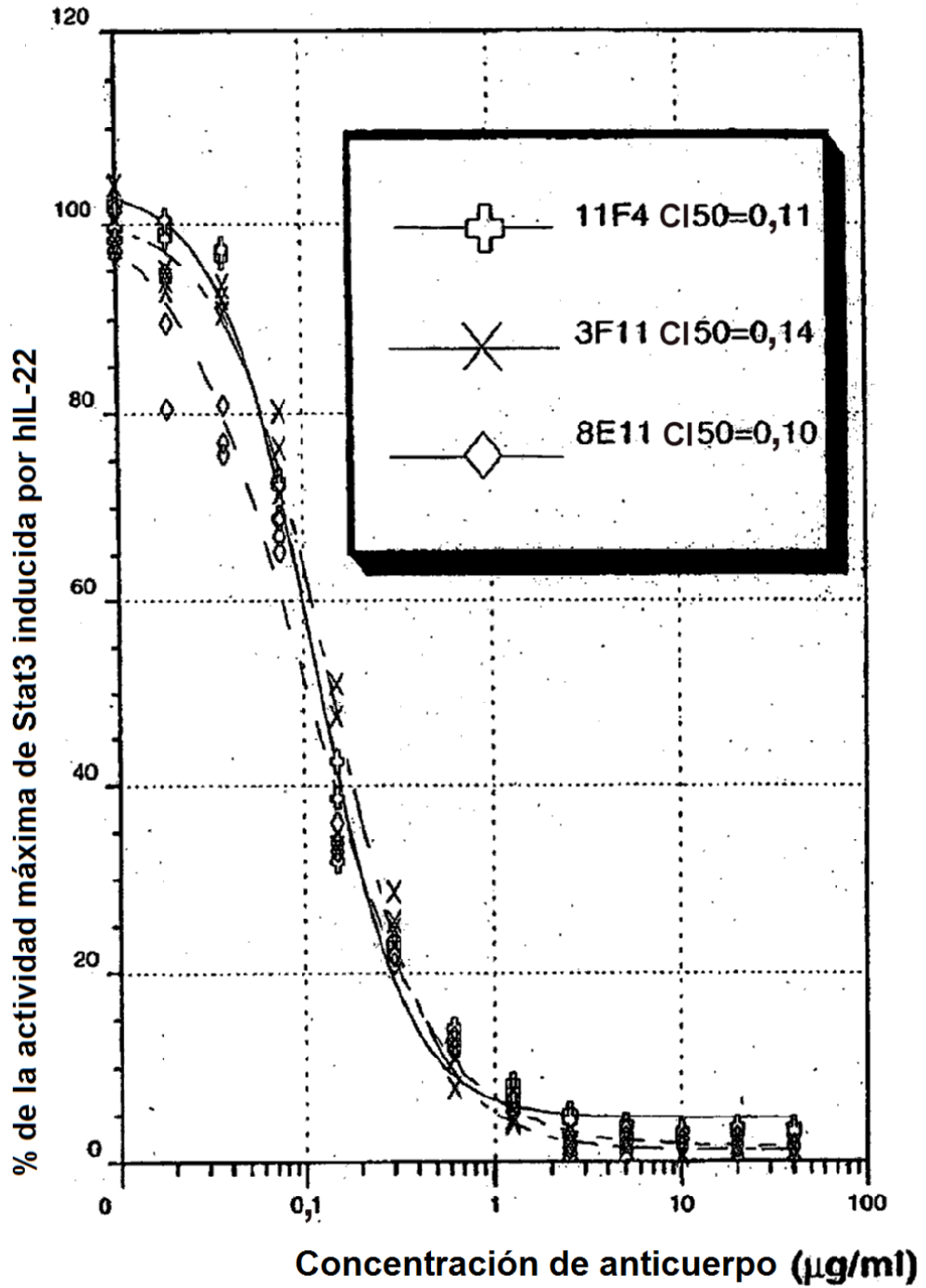


FIGURA 8

Curva de dosis de 11F4, 3F11 y 8E11 en mL-22L

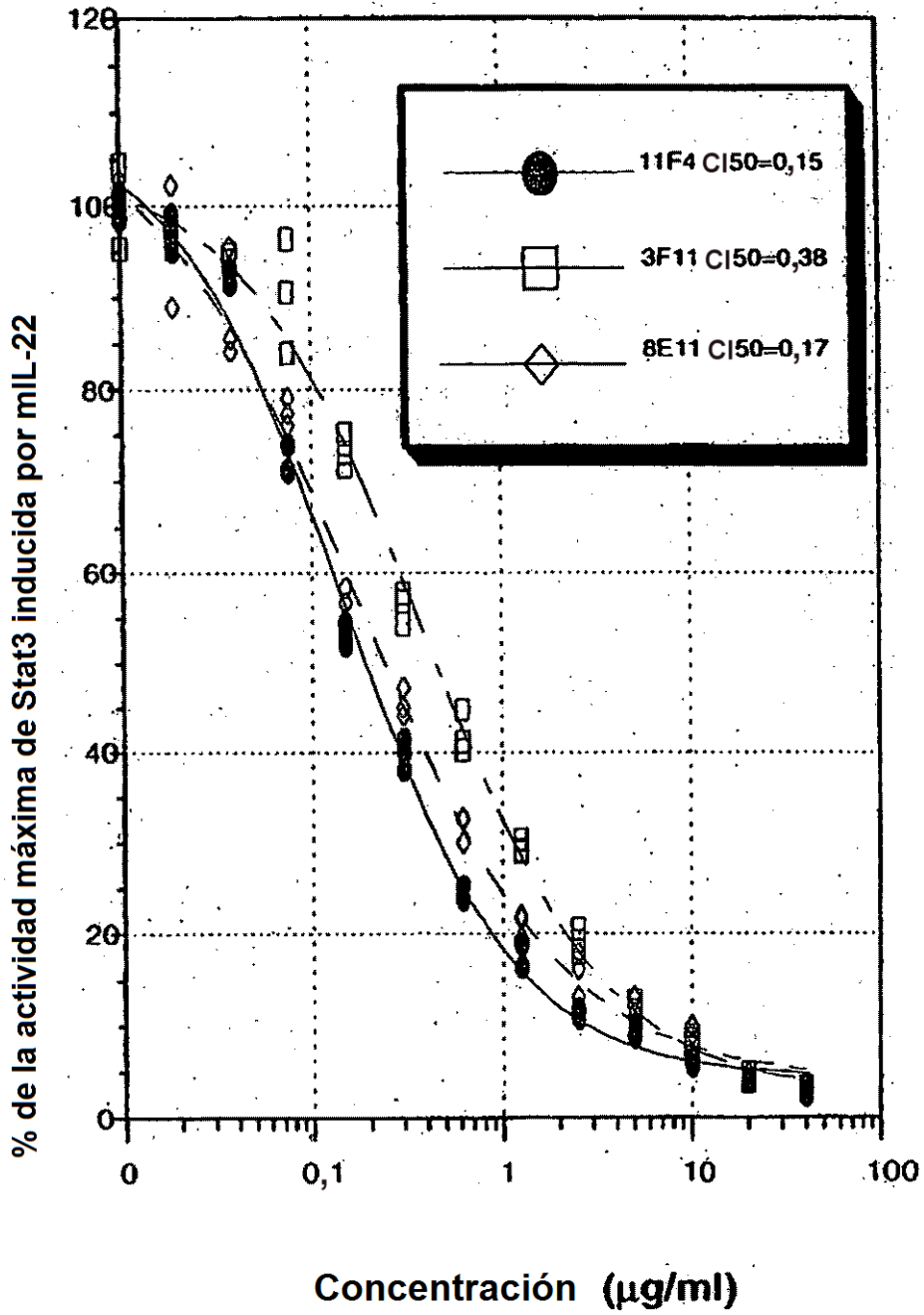


FIGURA 9

Afinidad de anticuerpos anti-IL-22 para hIL-22

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KP (nM)
11H4	1,21E+06	2,56E-04	0,21
8E11	4,98E+05	3,58E-04	0,72
3F11	ND	ND	ND

FIGURA 10

Detección de la producción de IL-22 mediante tinción de citocinas intracelulares

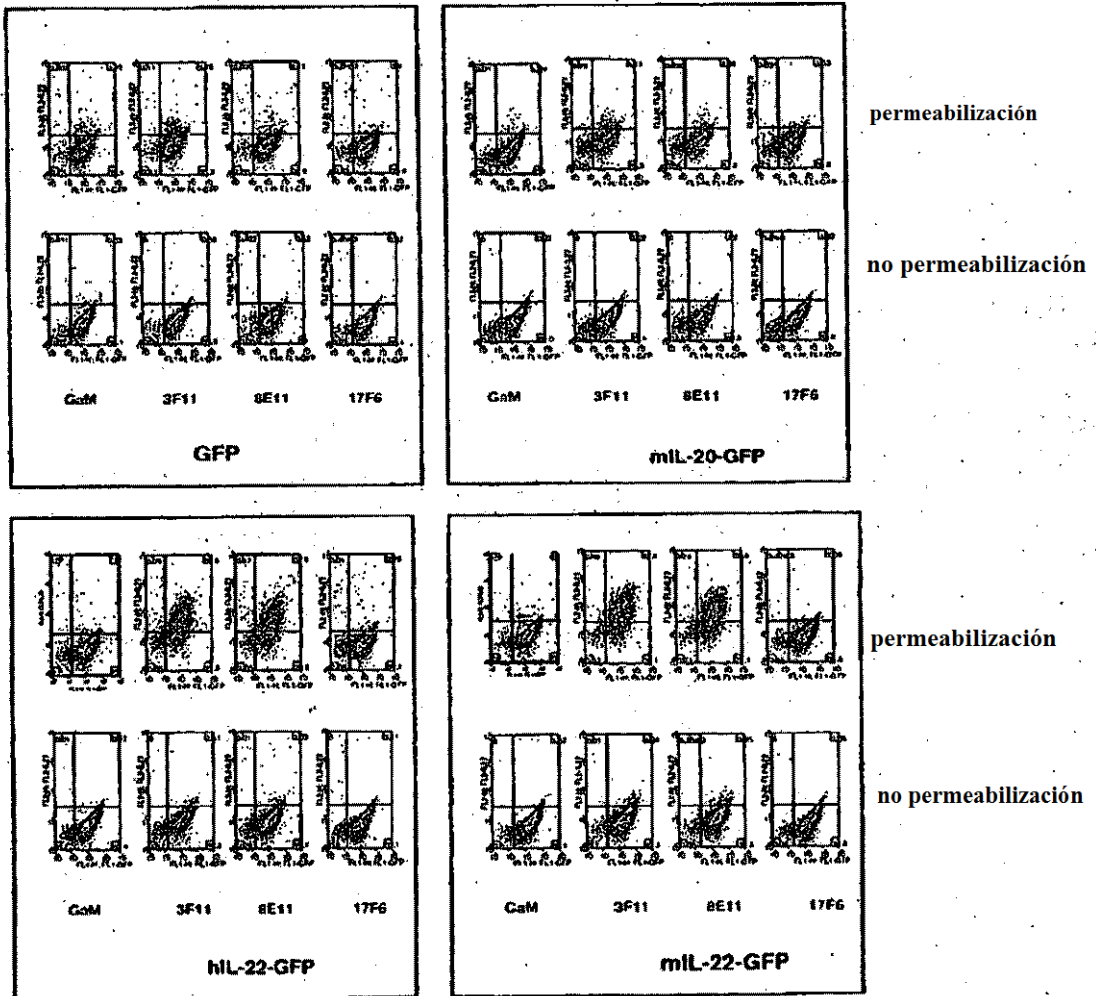


FIGURA 11

Anticuerpo marcado con APC para tinción de citocinas intracelulares

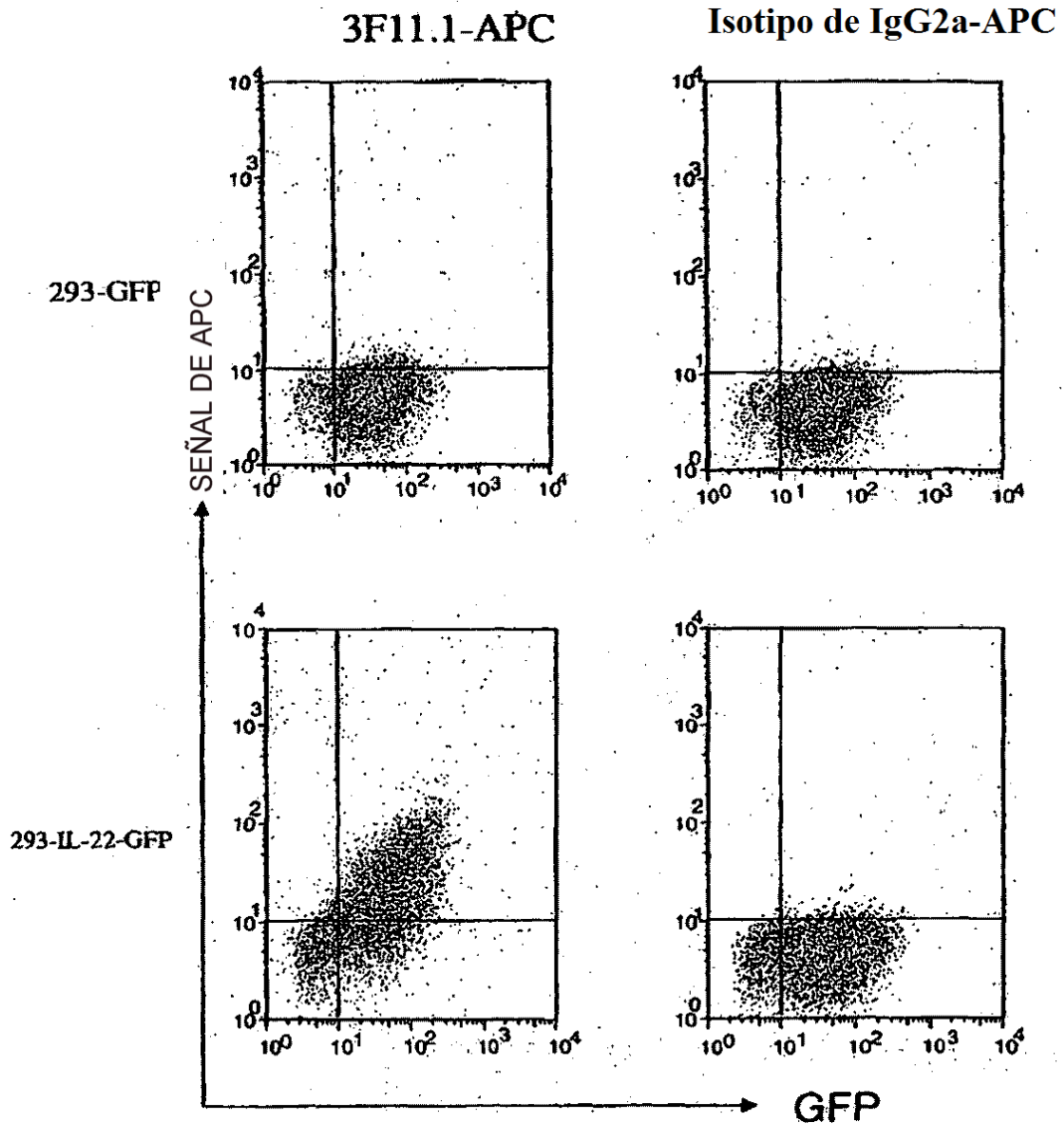


FIGURA 12

Expresión de IL-22 en células Th1 murinas

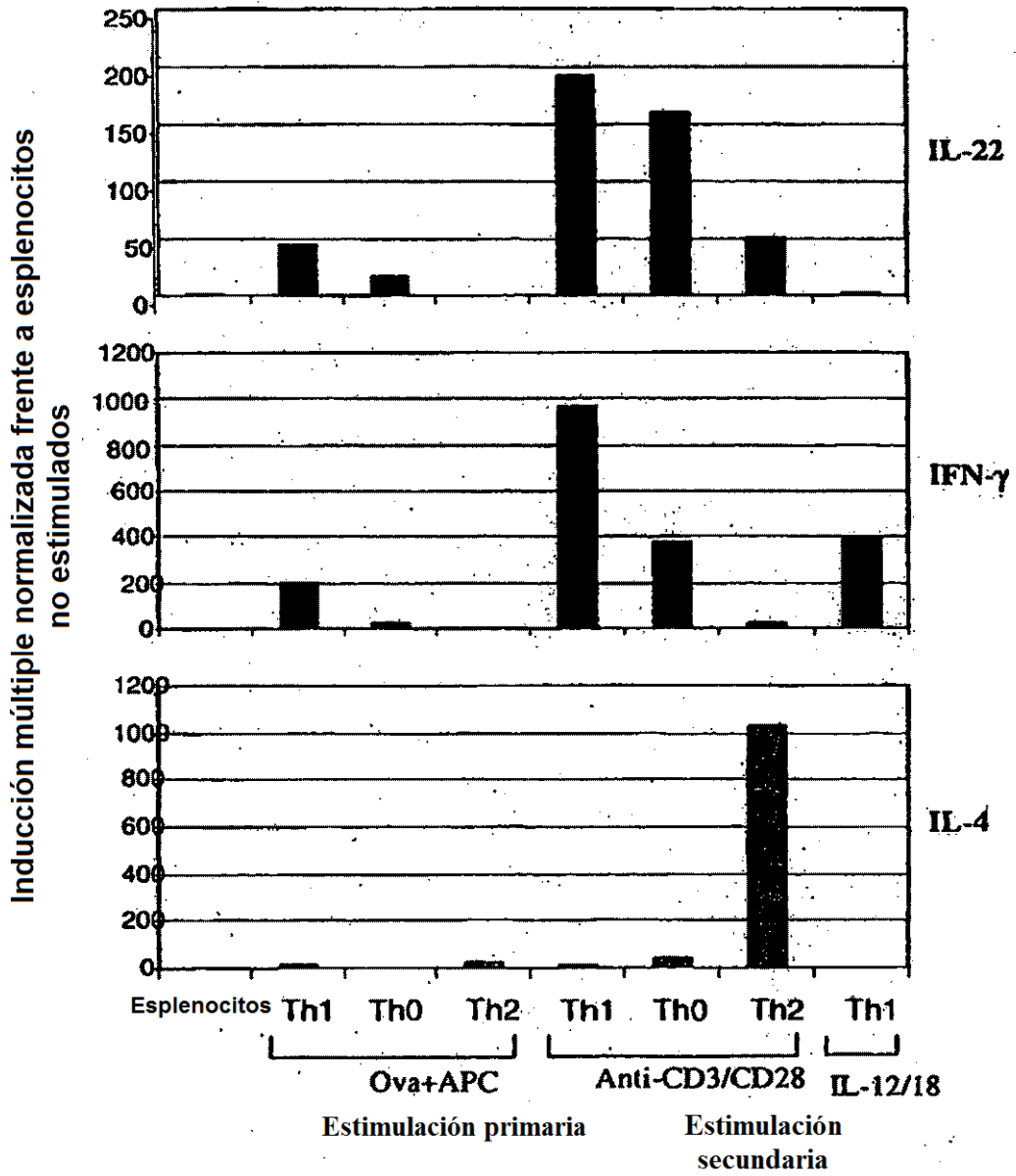


FIGURA 13

IL-22 también lo producen células T $\gamma\delta$

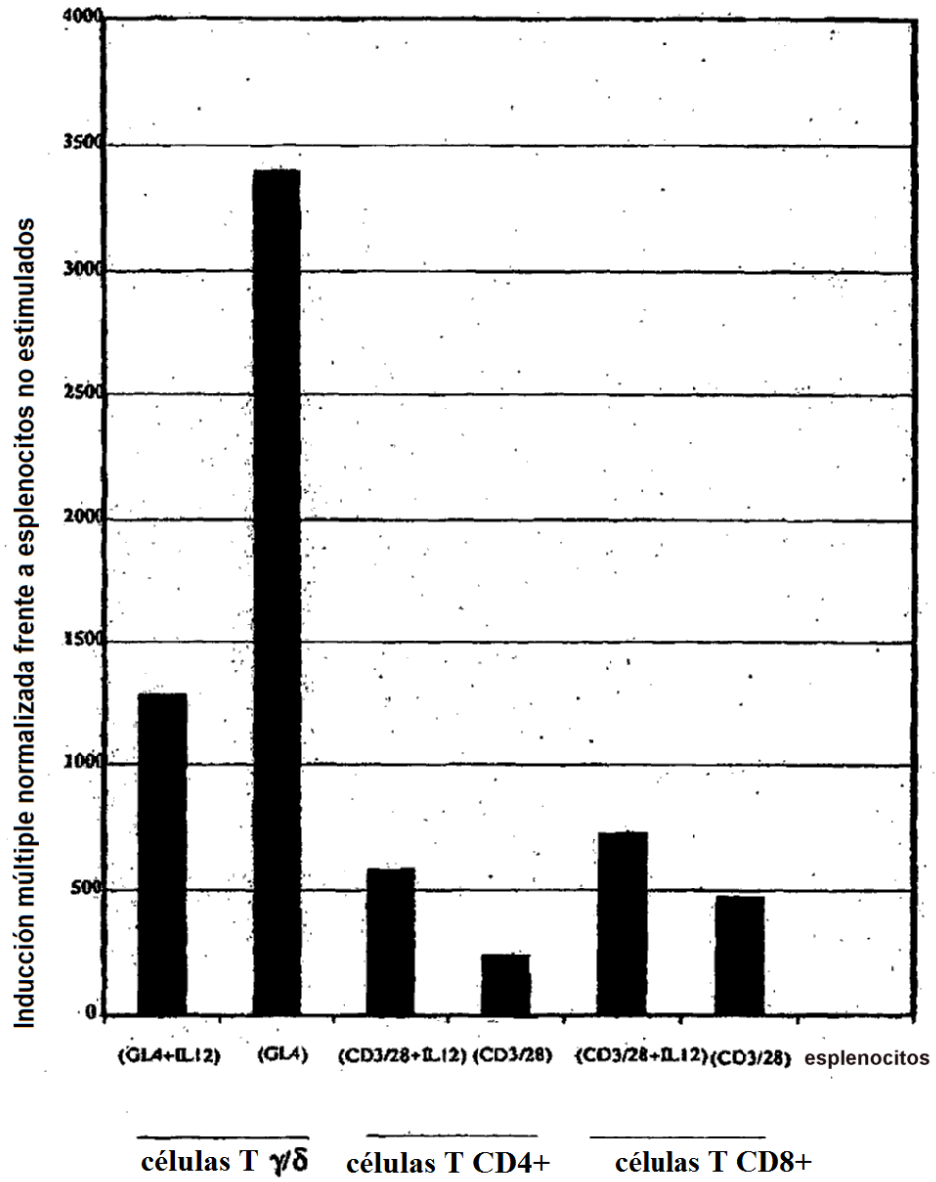


FIGURA 14

IL-22 lo producen células T humanas activadas

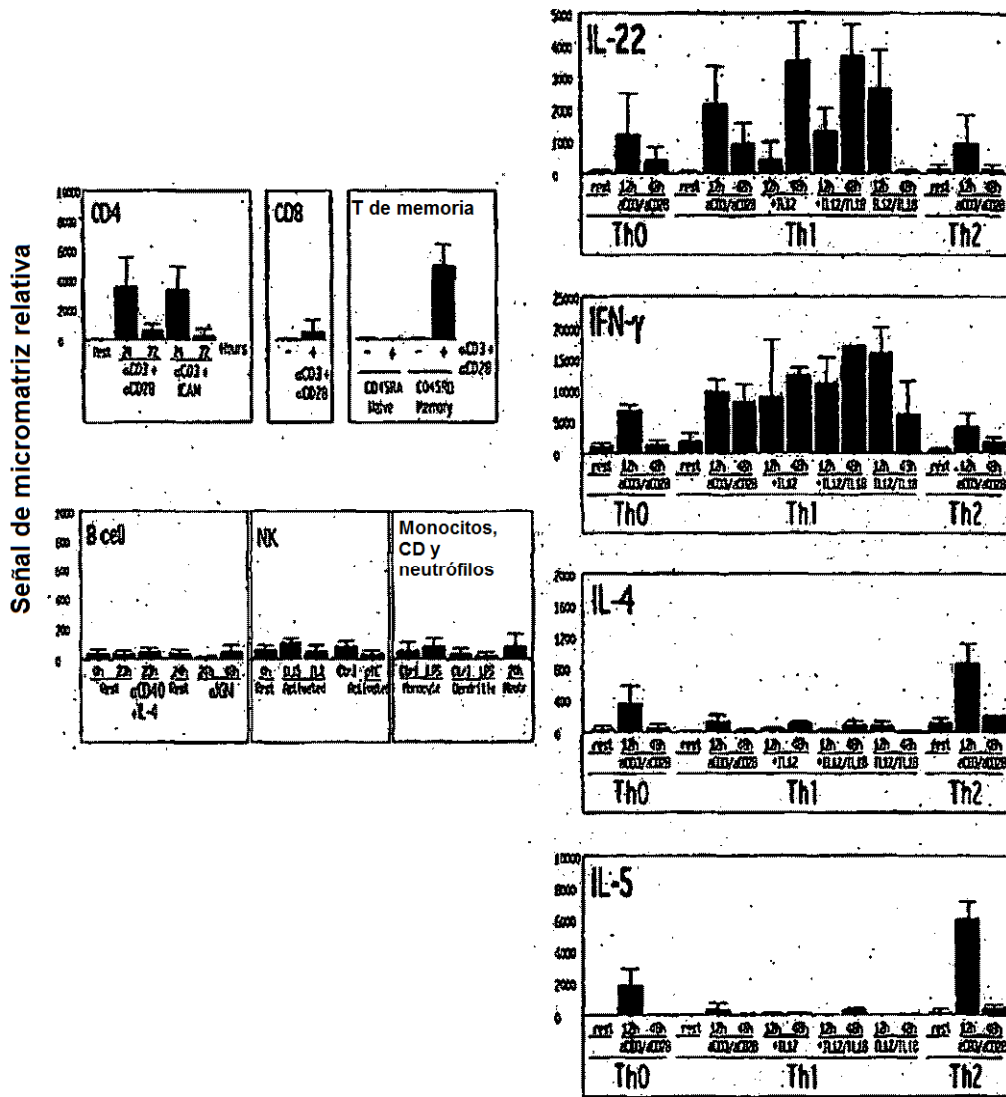


FIGURA 15

Detección de la producción de IL-22 a partir de células Th1 primarias mediante tinción de citocinas intracelulares

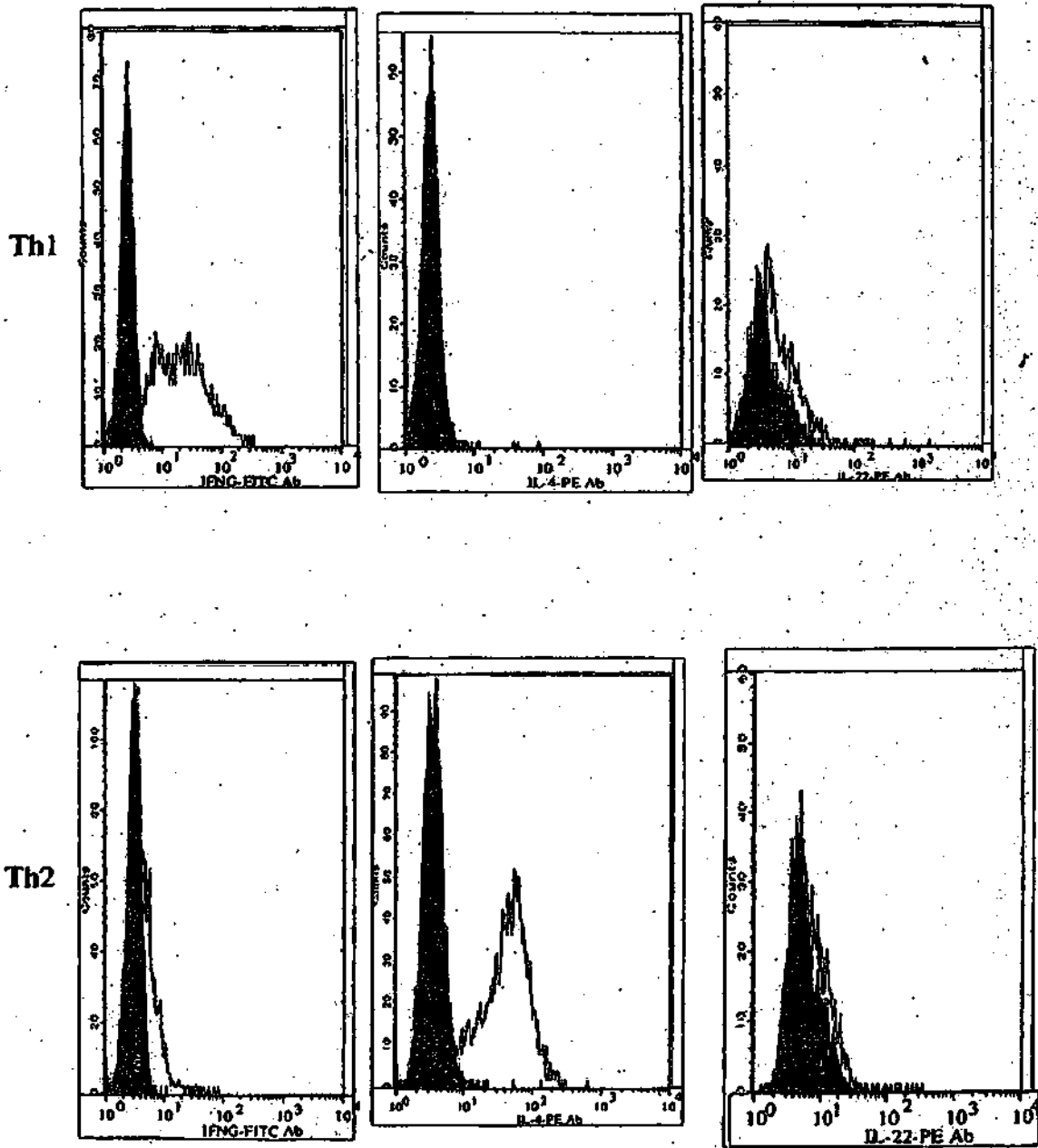


FIGURA 16

Generación de anticuerpos anti-IL-22R

Células 293 que expresan hIL-22R

Células 293

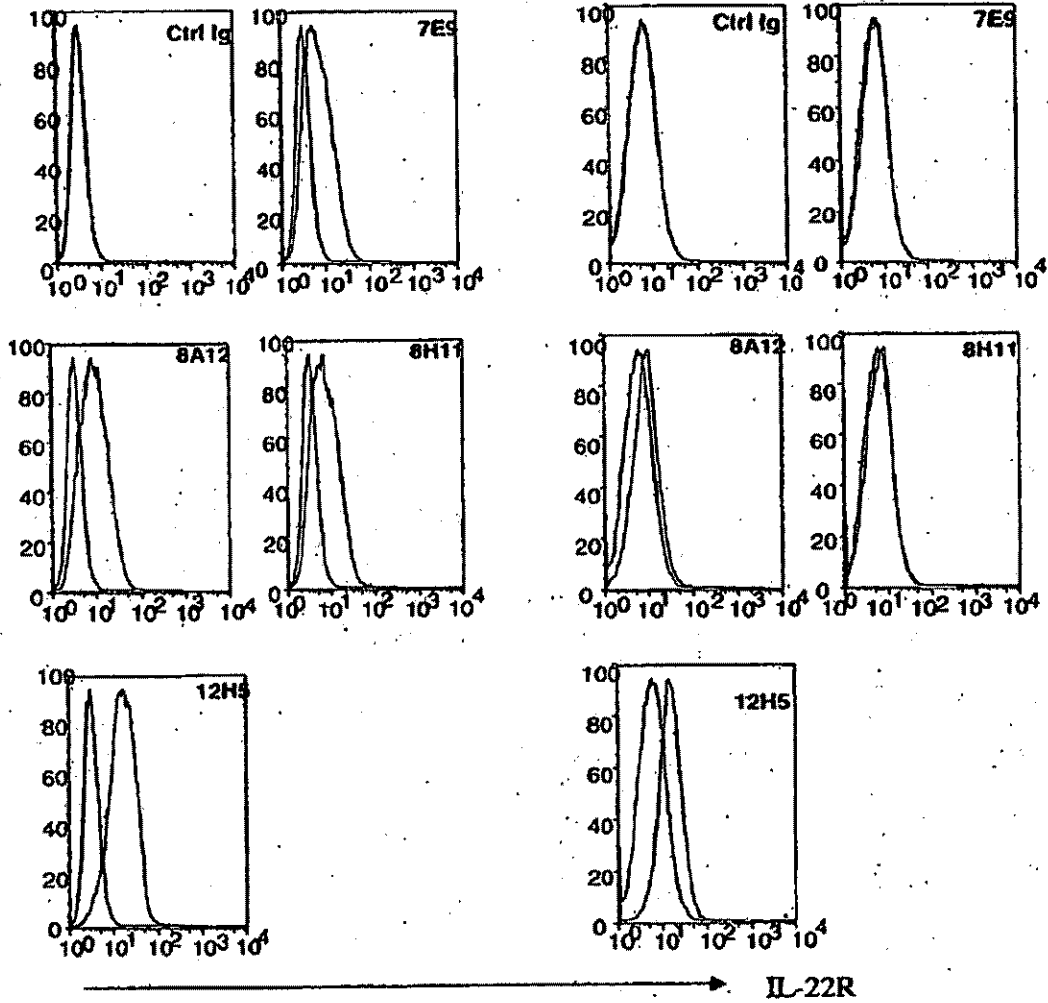


FIGURA 17

Bloqueo de la señalización de hIL-22 mediante anticuerpos contra hIL-22R

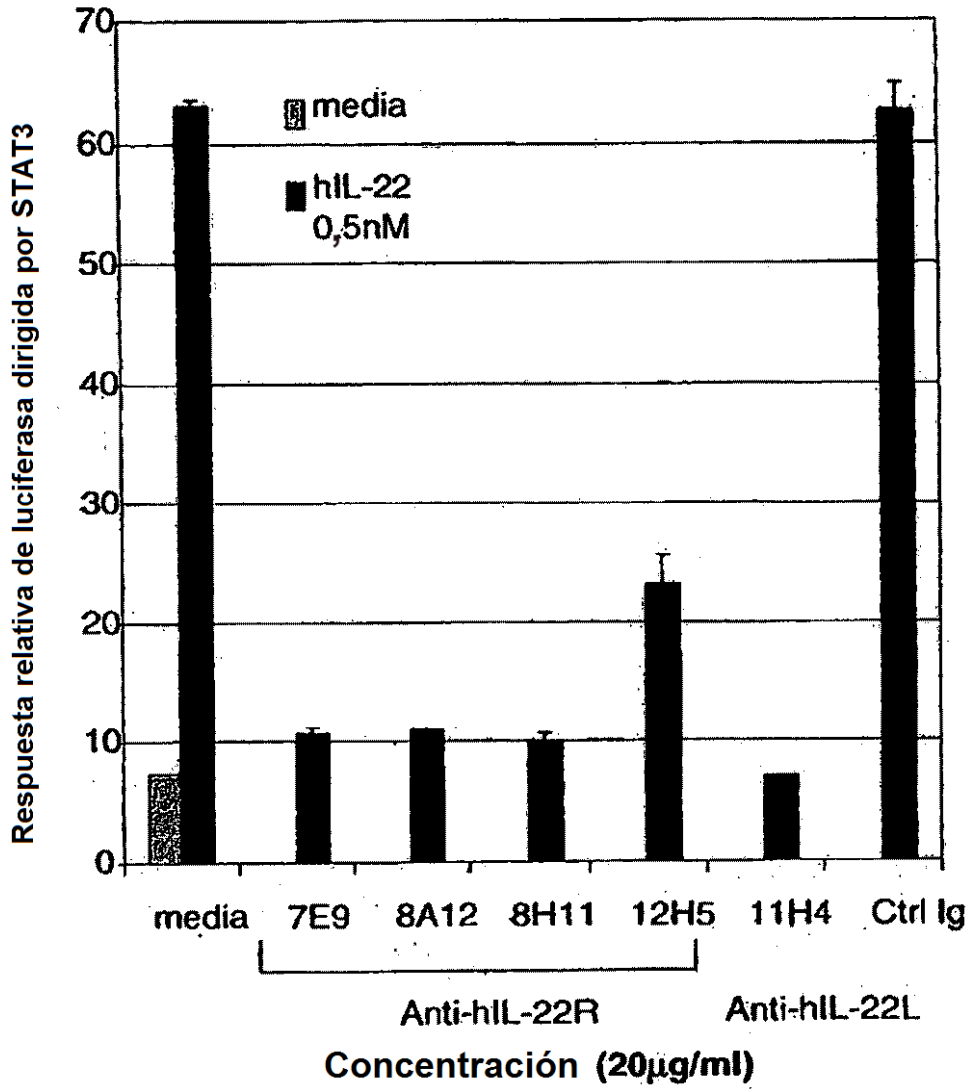


FIGURA 18

Expresión de IL-22R en queratinocitos primarios

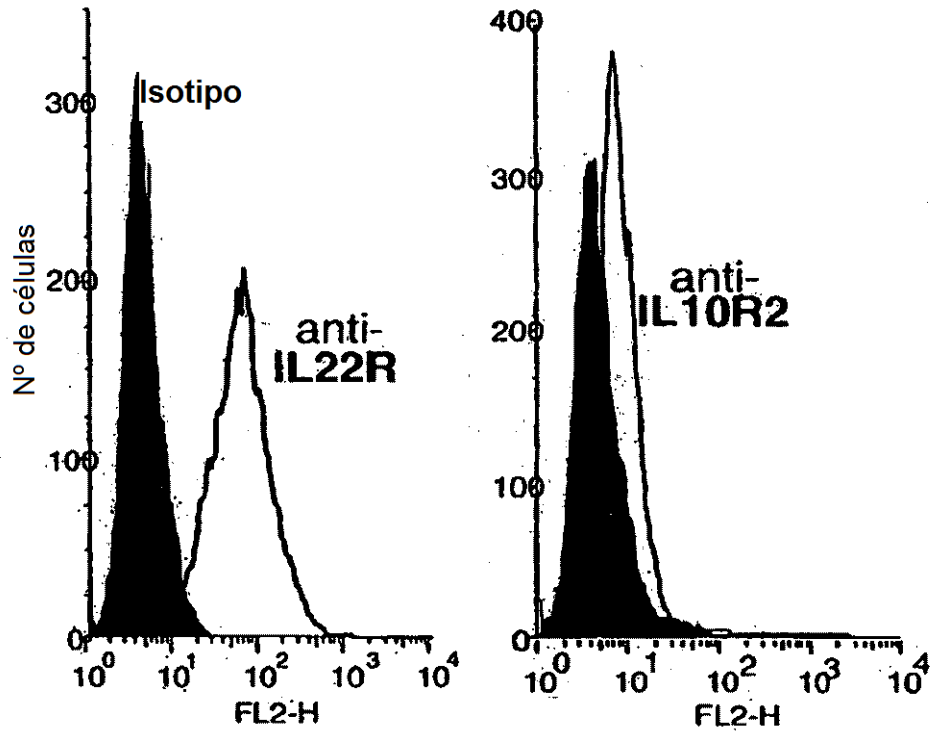


FIGURA 19

Efecto de la familia de citocinas de IL-10 en epidermis humana cultivada durante 4 días

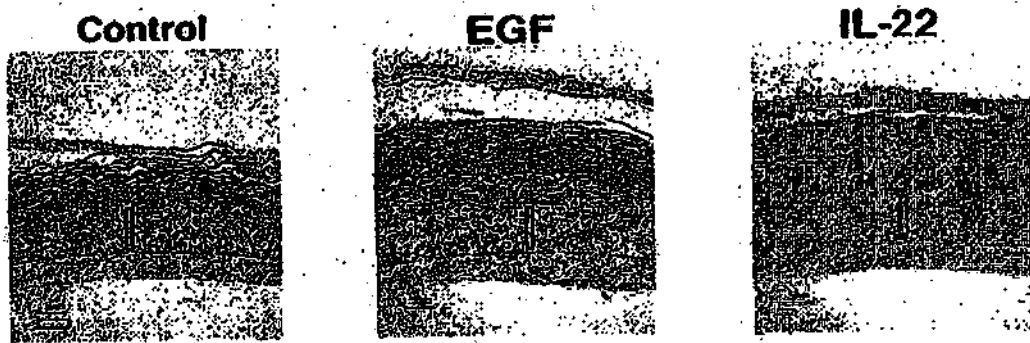


FIGURA 20

Efecto de la familia de citocinas de IL-10 en IHC de citoqueratina 16

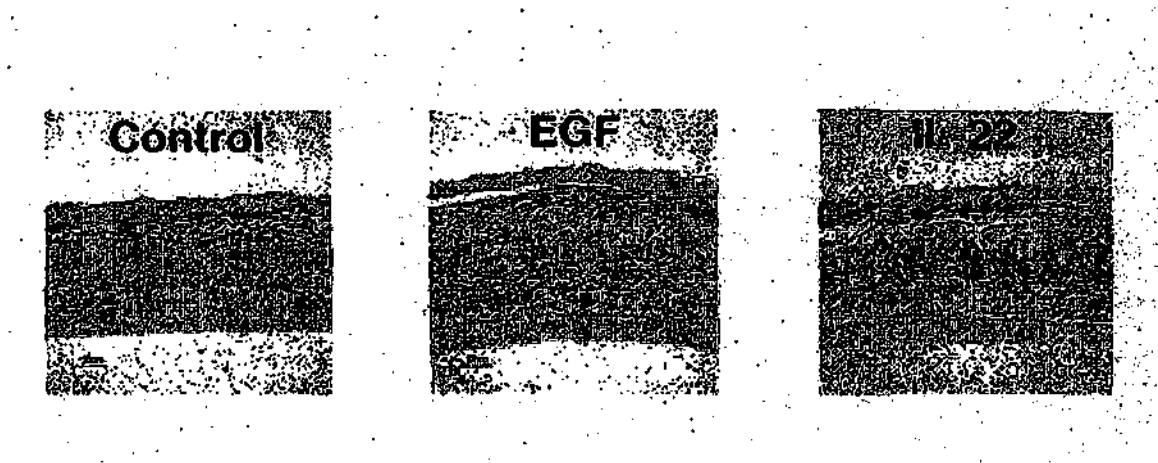



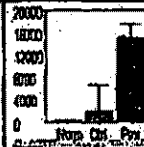


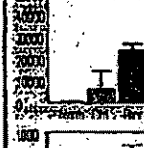
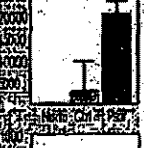

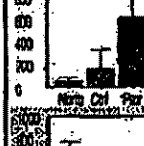



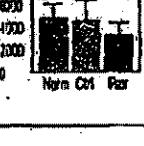
FIGURA 21

Efecto de la familia de citocinas de IL-10 en la IHC de psoriasina (S100A7)



FIGURA 22

Los genes inducidos por IL-22 de queratinocitos también están elevados en pieles psoriásicas

Expresión en pieles psoriásicas	Nombre del gen	Múltiplo de inducción por IL-22 en queratinocitos	Expresión en pieles psoriásicas	Nombre del gen	Múltiplo de inducción por IL-22 en queratinocitos	Expresión en pieles psoriásicas	Nombre del gen	Múltiplo de inducción por IL-22 en queratinocitos
	S100 A7	8,1		SCCA 2	3,2		Tubulina	2,1
	SPR-2G	1,1		S100A 9	2,6		SCCA 2	2,1
	Inhibidor de proteasa 3	4		MGC4 504	2,3		ET1R	2,0
	Queratina 23	3,3		EFFV 4678	2,2		TXNIP(p)	2,0

Criterios de selección: ≥ 2 veces de inducción por IL-22L en queratinocitos.
 nivel mínimo de expresión > 500 en ambas microplacas.

Hay un total de 47 sondas que mostraron una inducción de más de 2 veces por IL-22 de queratinocitos

FIGURA 23

Inducción de la expresión de psoriasina por IL-22 bloqueada mediante Abs para IL-22 o IL-22R

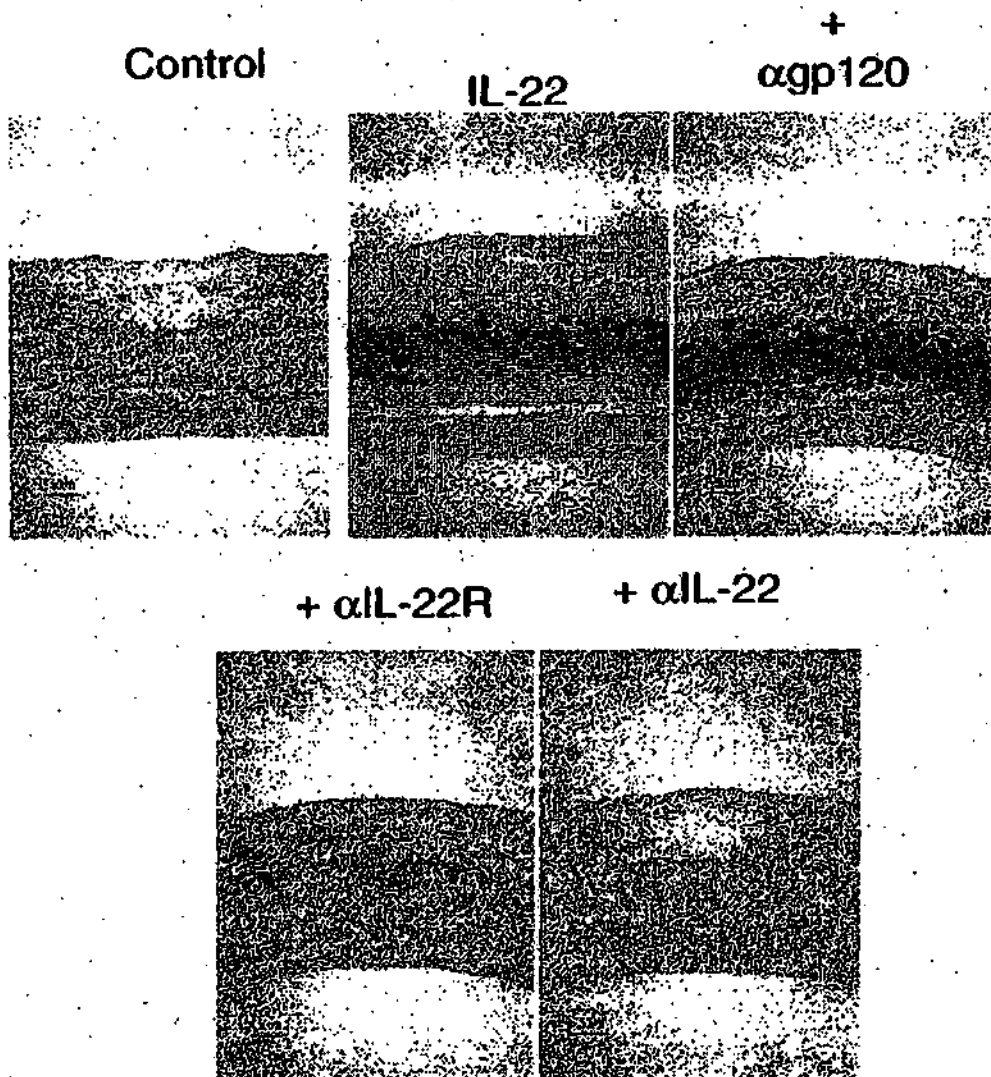


FIGURA 24

El engrosamiento epidérmico inducido por IL-22
puede bloquearse
con Abs para IL-22 o IL-22R

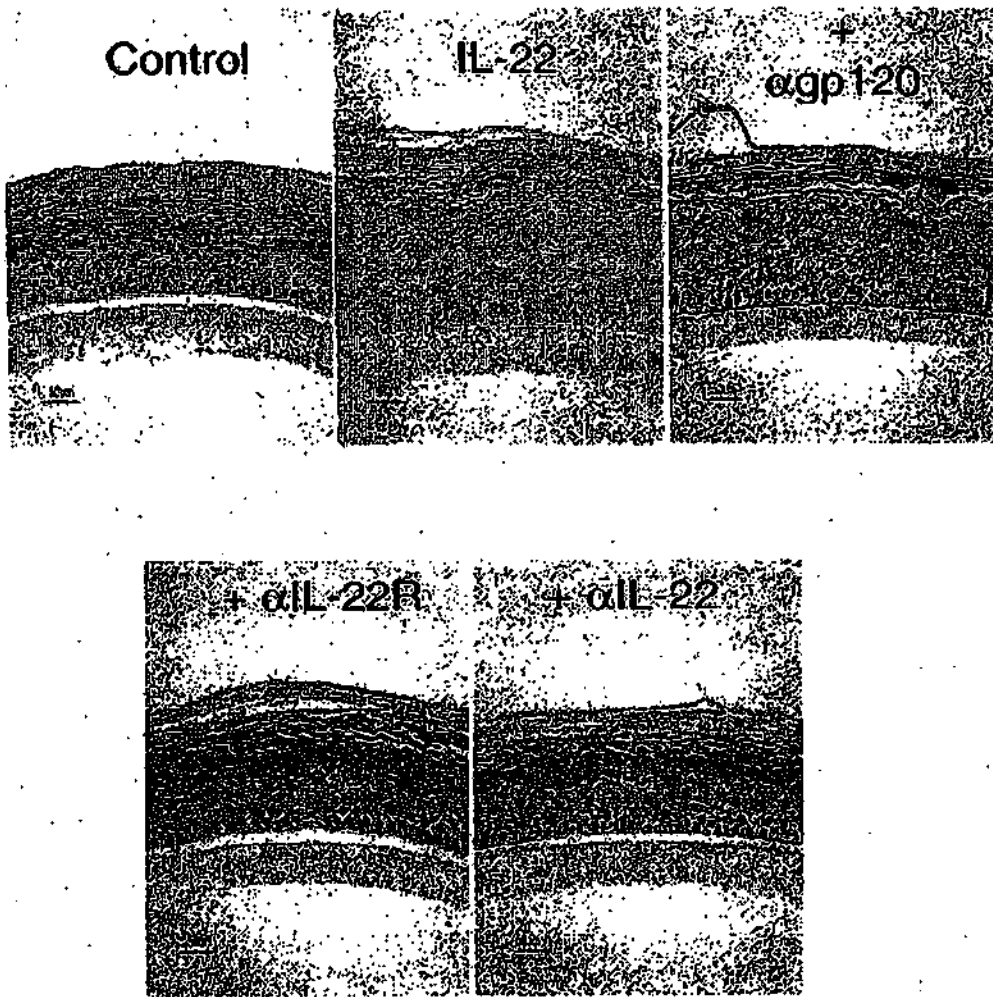


FIGURA 25

El engrosamiento epidérmico inducido por IL-22
puede bloquearse
con Abs para IL-22 o IL-22R

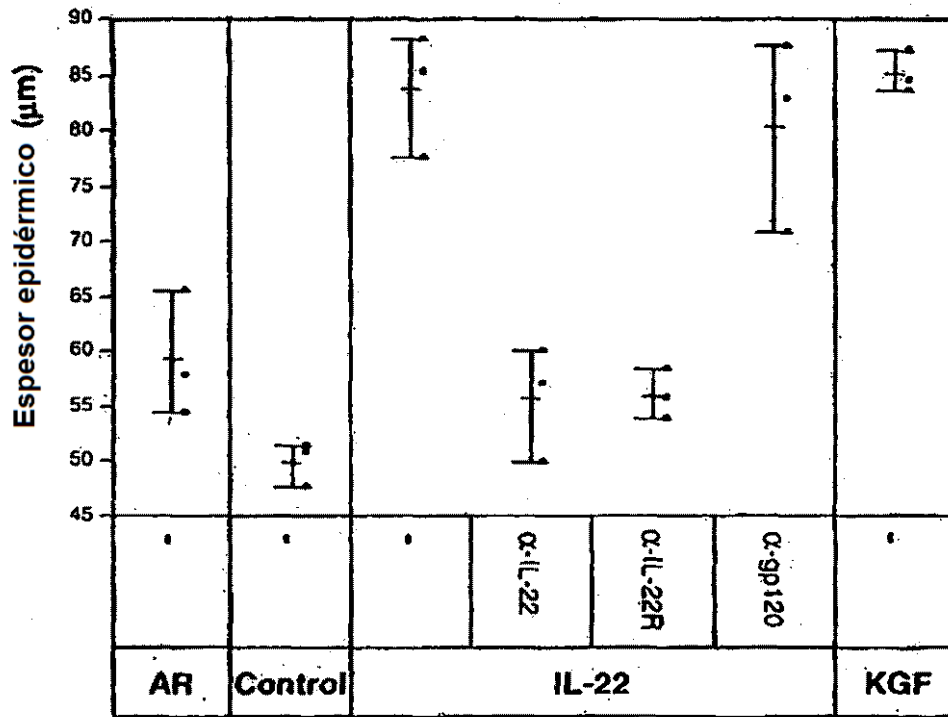


FIGURA 26

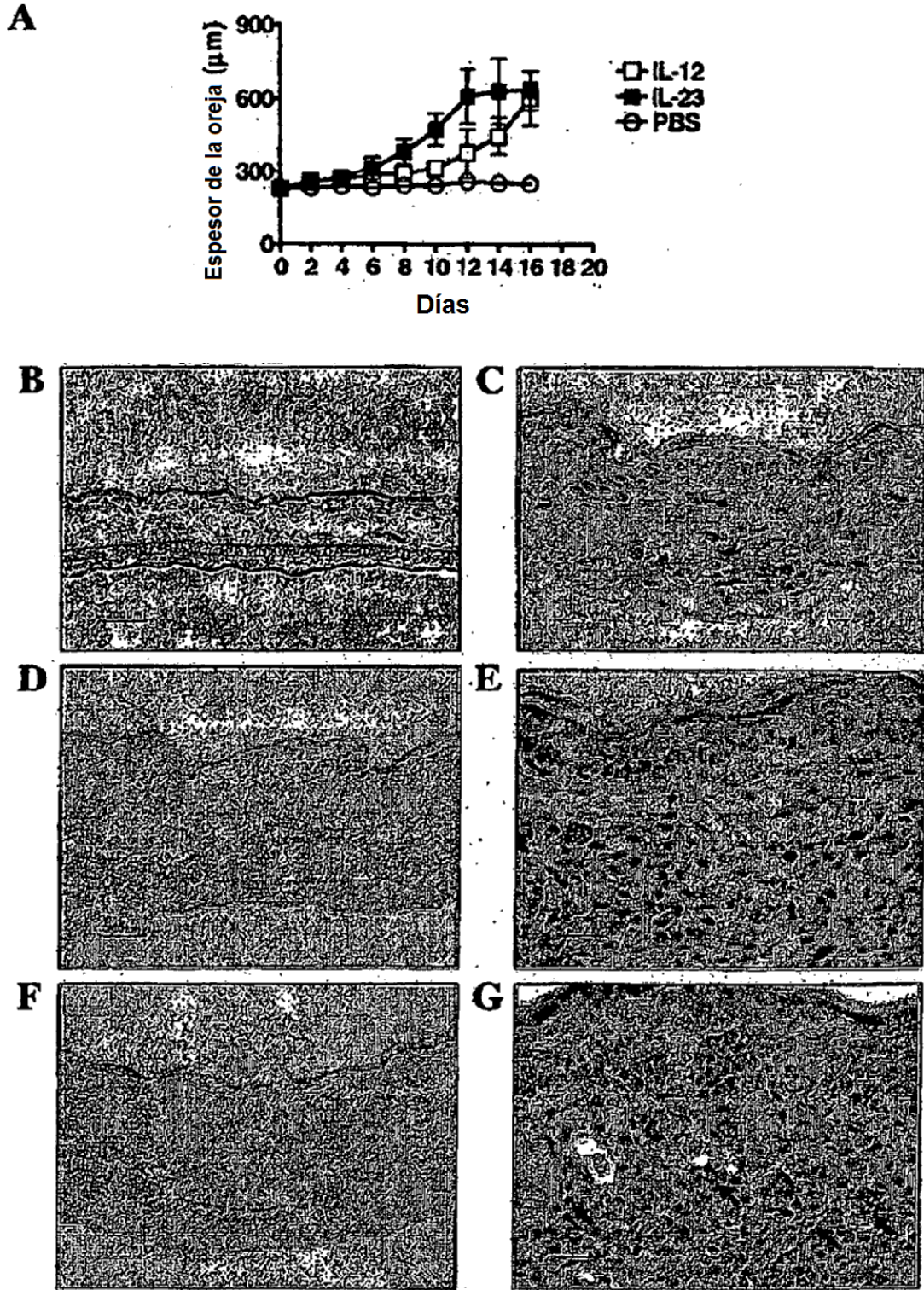


FIGURA 27

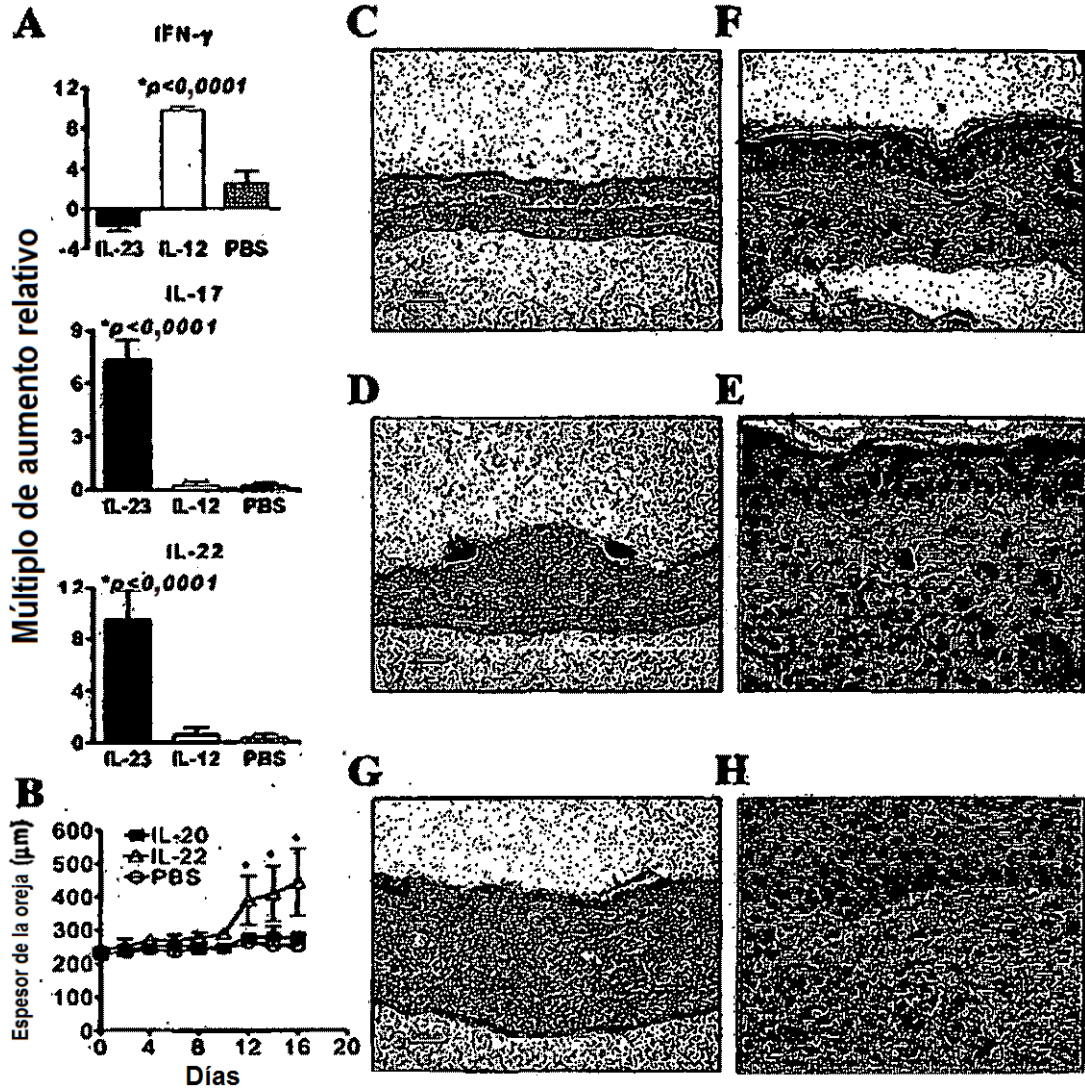


FIGURA 28

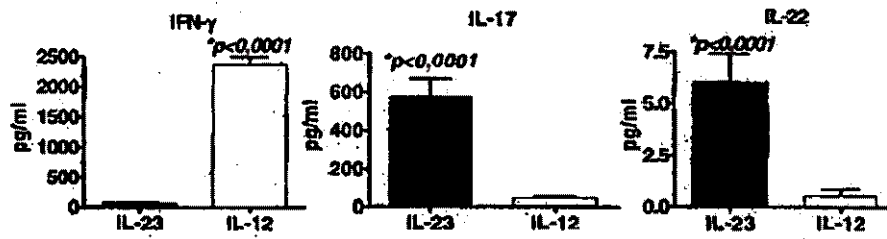
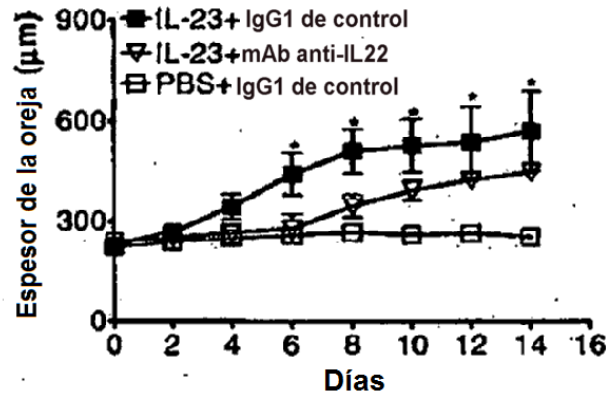
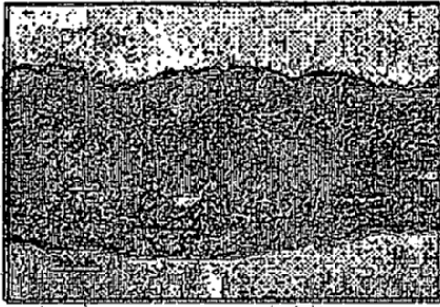


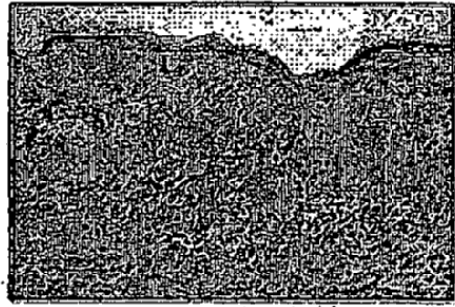
FIGURA 29



B IL-23 + IgG1 de control



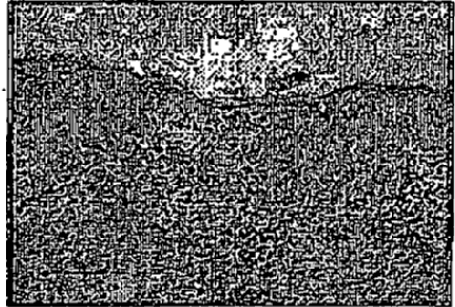
C IL-23 + IgG1 de control



D IL-23+mAb anti-IL22



E IL-23+mAb anti-IL22



F PBS + IgG1 de control



G PBS + IgG1 de control



FIGURA 30

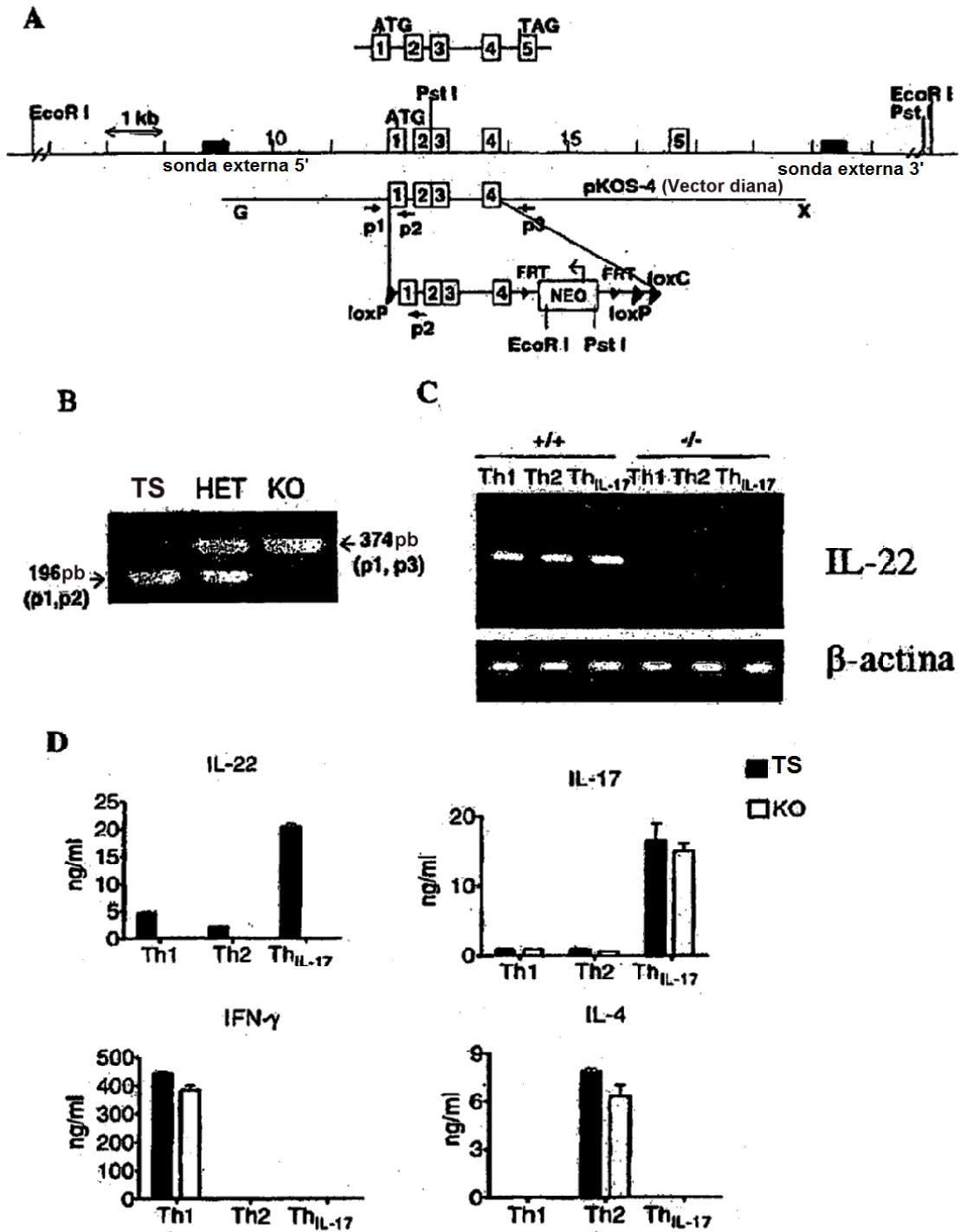


FIGURA 31

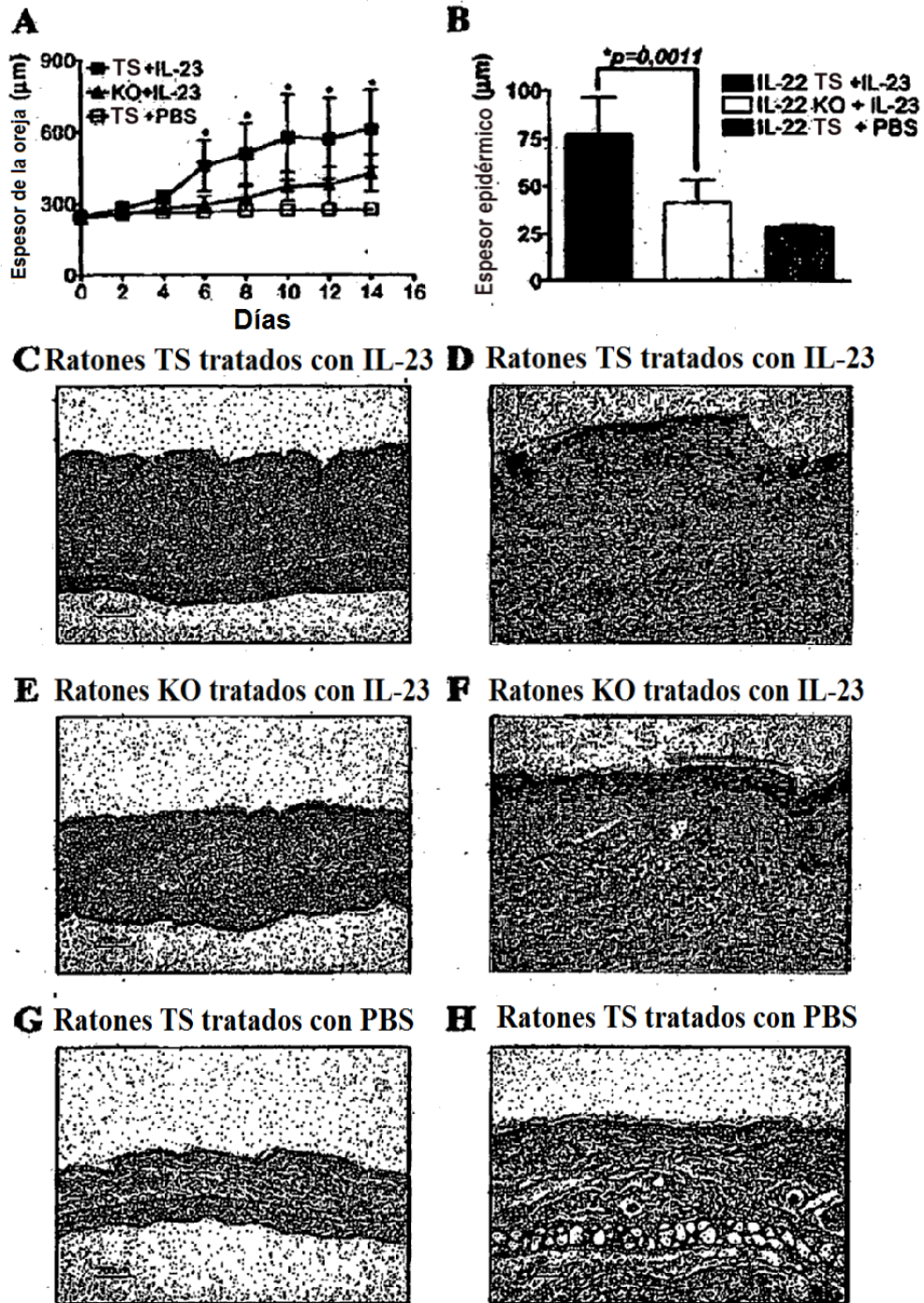


FIGURA 32

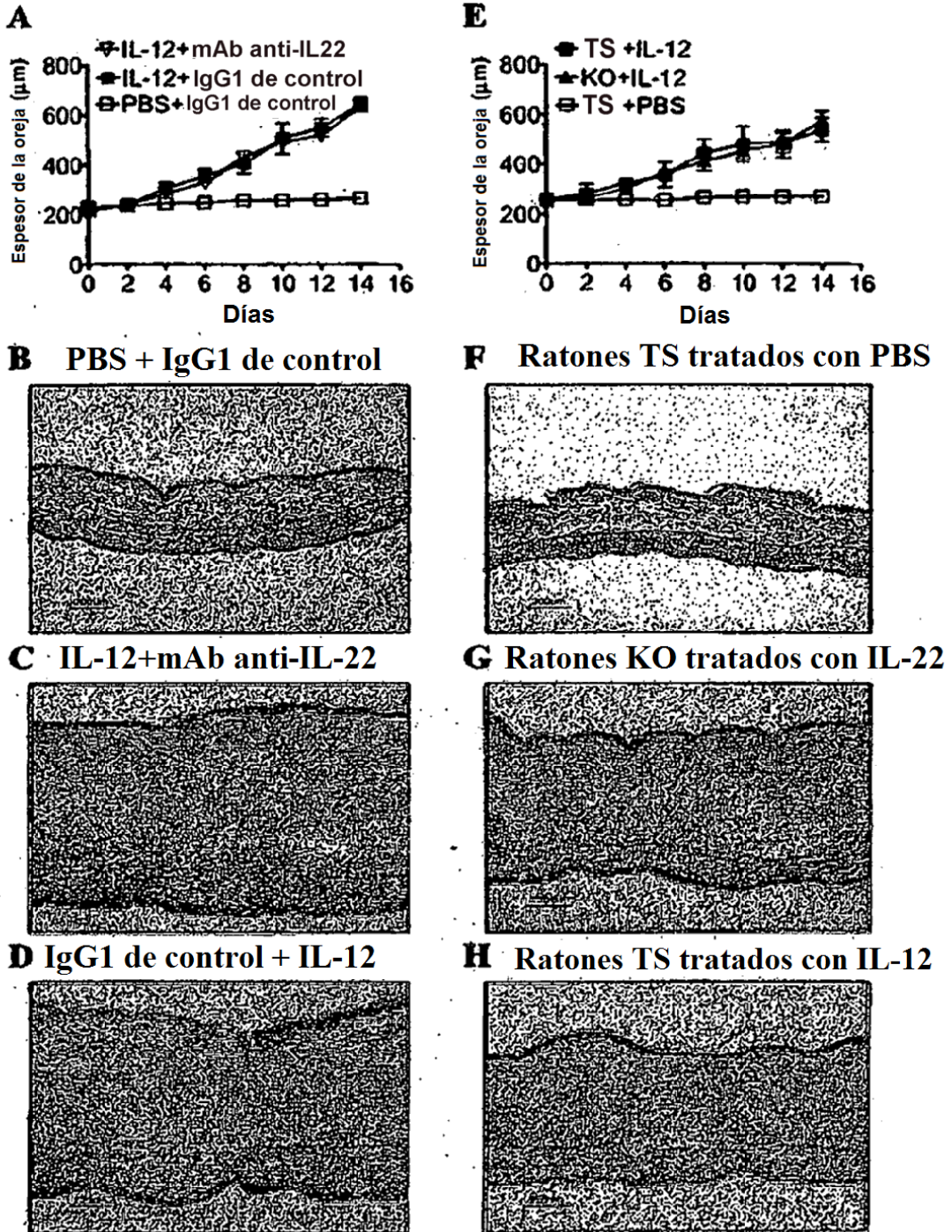


FIGURA 33

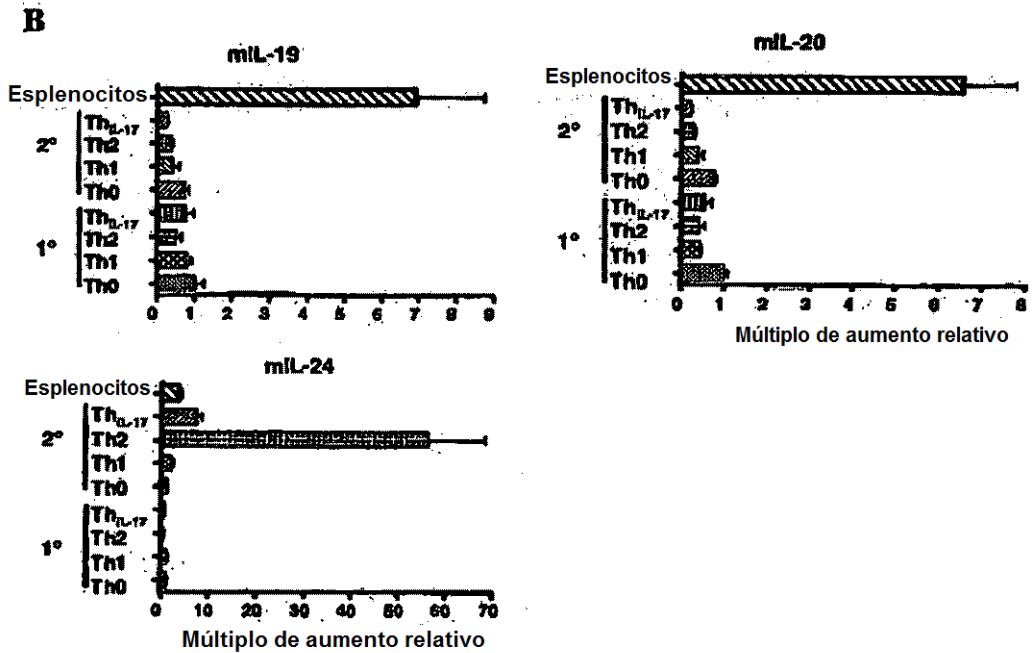
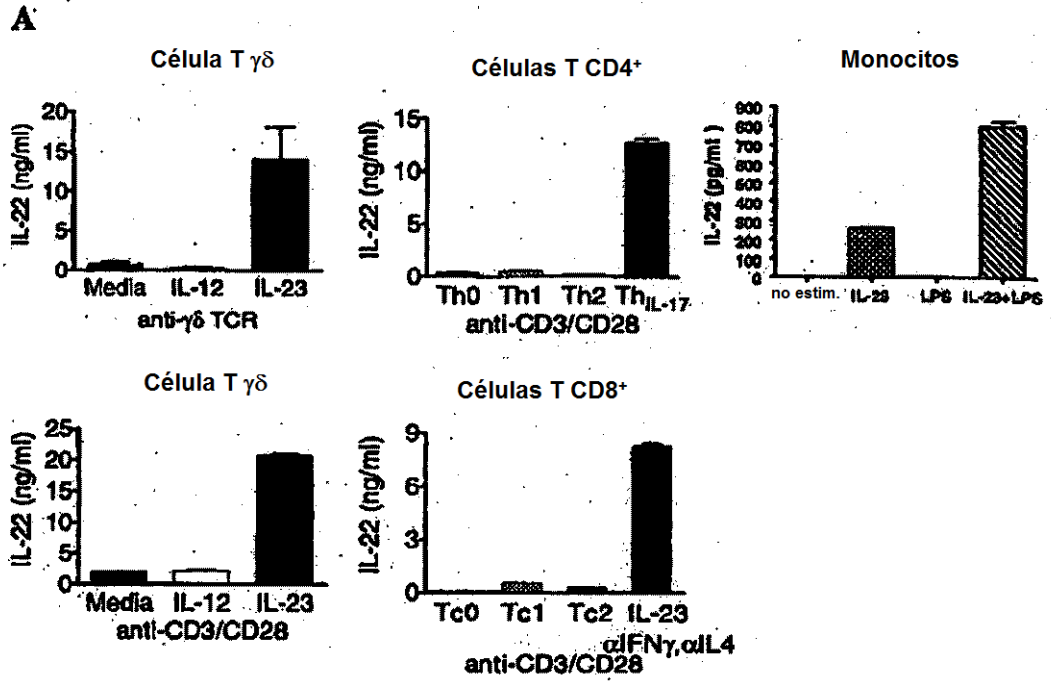
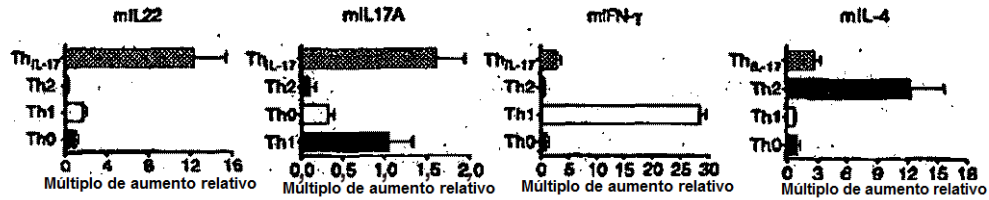


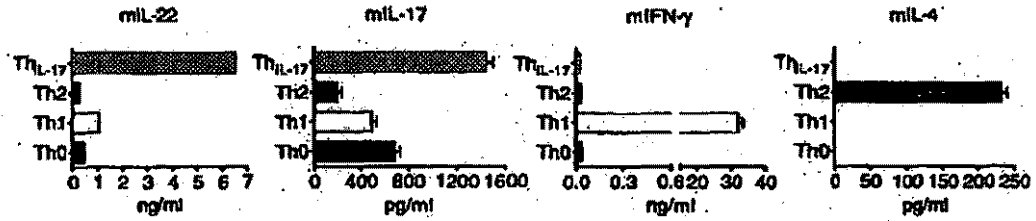
FIGURA 34

A Diferenciación de células T transgénica DO11.10 TCR, primarias 48 horas

RT-PCR en tiempo real:



ELISA:



B Diferenciación de células T transgénicas DO11.10 TCR, reestimulación con anti-CD3/28 48 horas

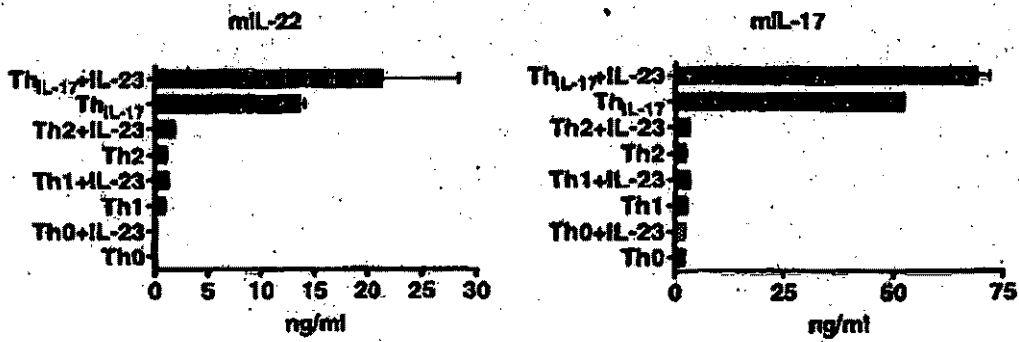
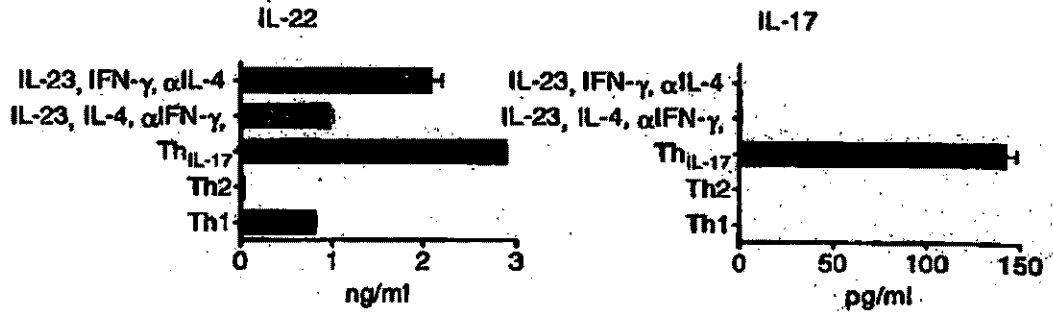
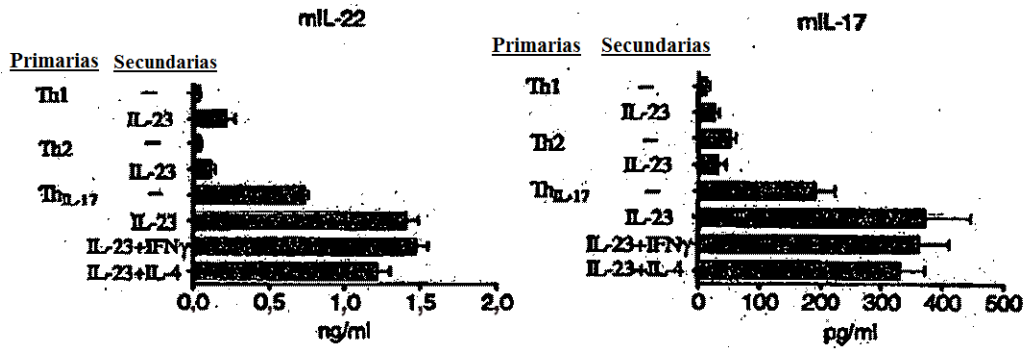


FIGURA 35

A



B



C

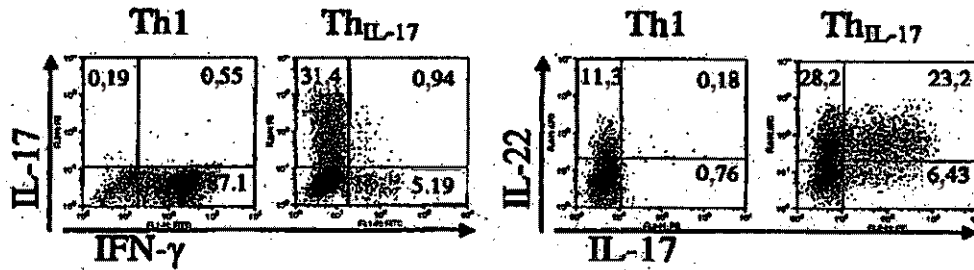


FIGURA 36

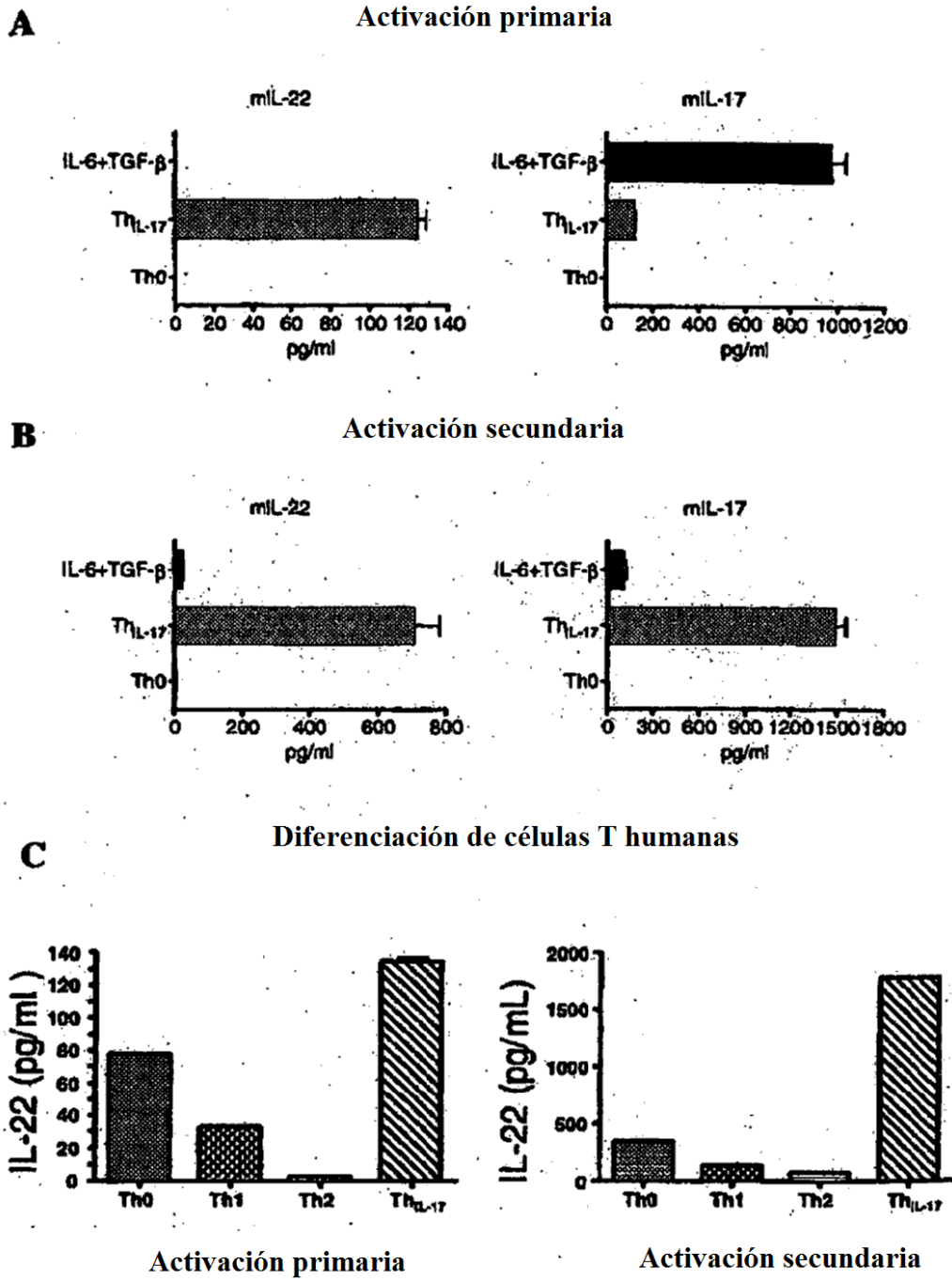


FIGURA 37

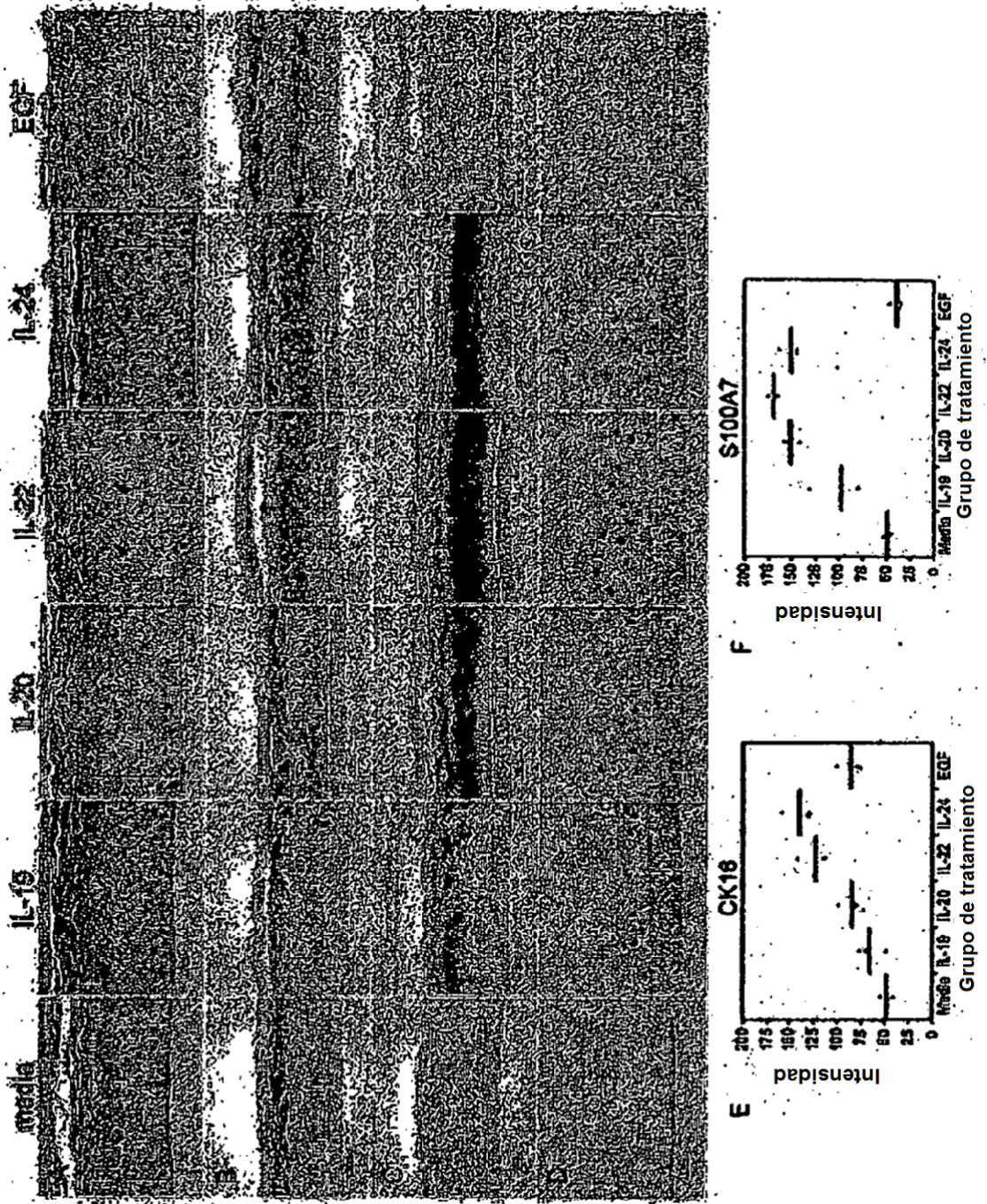


FIGURA 38

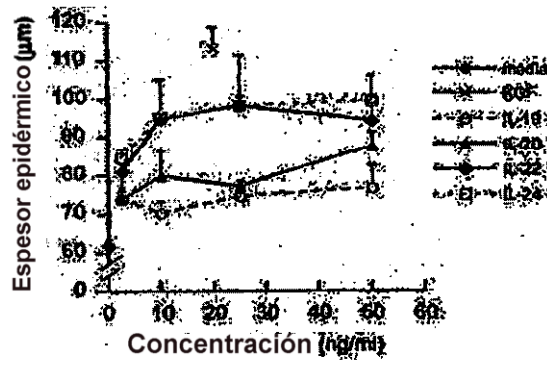


FIGURA 39

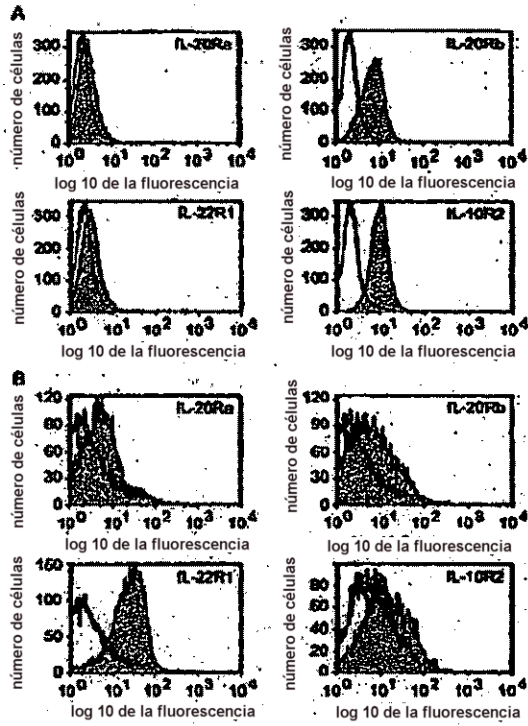


FIGURA 40

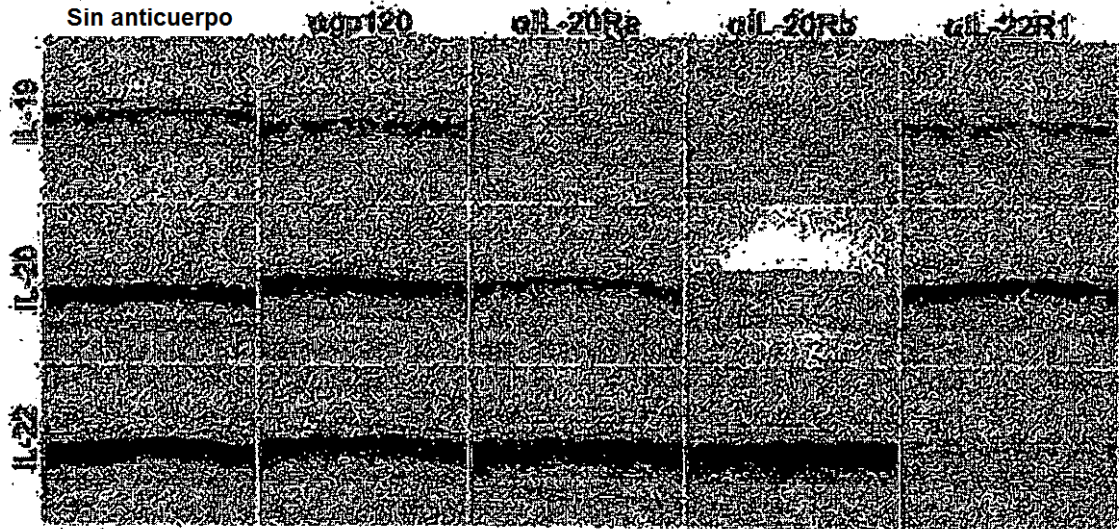


FIGURA 41

