

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 309**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2011 PCT/CN2011/079124**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12028089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2011 E 11821115 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2633865**

54 Título: **Uso de interleuquina-22 en el tratamiento de la hepatitis viral**

30 Prioridad:

**31.08.2010 CN 201010268320**

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

**09.03.2018**

73 Titular/es:

**GENERON (SHANGHAI) CORPORATION LTD.  
(100.0%)**

**Suite 307, 1011 Ha Lei Road, Z.J. Hi-Tech Park,  
Pudong District  
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**YAN, XIAOQIANG;  
HUANG, ZHIHUA;  
YANG, HONGZHOU y  
HUANG, YULIANG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 658 309 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).

**Uso de interleuquina-22 en el tratamiento de la hepatitis viral****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

**[0001]** Esta invención se refiere al área de las tecnologías biológicas y médicas; en particular, esta invención se refiere al uso de interleuquina-22 en el tratamiento de la hepatitis viral.

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0002]** La hepatitis viral es una inflamación del hígado causada por virus de hepatitis A, B, C, D o E. Todos los virus de hepatitis pueden causar hepatitis aguda; Además, la hepatitis B, C o D pueden causar hepatitis crónica que puede conducir a cirrosis, insuficiencia hepática y cáncer de hígado.

**[0003]** Por ejemplo, en los Estados Unidos, hay unos 500 a 600 mil nuevos casos de hepatitis viral, en los que la hepatitis A, una enfermedad aguda causada por el virus de la hepatitis A, representa 150 mil casos. Mientras tanto, hay un aumento de 200 a 300 mil nuevos casos de hepatitis B, en los que entre 6 y 10% de los casos de hepatitis B se convierten en hepatitis B crónica. Los casos de hepatitis B crónica pueden convertirse fácilmente en cirrosis, insuficiencia hepática y cáncer de hígado. Se estima que hay unos 200 a 300 millones de casos de hepatitis B crónica en todo el mundo y Estados Unidos representa 1,2 millones de los casos. La hepatitis B es causada por el virus de la hepatitis B. Además, hay alrededor de 150 mil nuevos casos de hepatitis C cada año (la hepatitis C se conocía anteriormente como hepatitis no A no B). Aproximadamente el 50 al 70% de los casos de hepatitis C aguda se convierten en casos de hepatitis C crónica y los casos de hepatitis C crónica pueden convertirse fácilmente en cirrosis, insuficiencia hepática y cáncer de hígado. Se estima que hay aproximadamente 3,5 millones de casos de hepatitis C crónica en los Estados Unidos. Ambos casos crónicos de hepatitis B y C pueden convertirse en hepatitis crónica. Bajo la condición de hepatitis crónica, el virus de la hepatitis continuaría viviendo y se duplicaría dentro del hígado durante un largo período de tiempo, lo que al mismo tiempo causaría una inflamación crónica del hígado, lo que provocaría cirrosis, insuficiencia hepática y cáncer de hígado.

**[0004]** Por ejemplo, en China, hay entre 500 y 600 mil nuevos casos de hepatitis viral en los que la hepatitis A representa 150 mil casos.

**[0005]** El diagnóstico de hepatitis viral se basa en la detección de la presencia de anticuerpos contra el virus, material genético viral, proteína viral y antígeno. Los biomarcadores importantes en el desarrollo del daño tisular hepático derivado de la hepatitis son el aumento de la actividad de las enzimas sanguíneas y las transaminasas, como la aminotransferasa de aspartato (AST o S (GOT)) y aminotransferasa de alanina (ALT o SGPT).

**[0006]** Los métodos para tratar la hepatitis aguda y crónica son diferentes. Para el tratamiento de la hepatitis viral aguda (hepatitis A), el primer paso es aliviar los síntomas de náuseas, vómitos y dolor abdominal del paciente. Actualmente no existe una cura para la hepatitis A desde el punto de vista clínico, y la terapia se centra en garantizar que los pacientes tengan suficientes suplementos nutricionales y en evitar una lesión hepática permanente. Los pacientes con hepatitis aguda se pueden tratar con inmunoglobulina dentro de las 2 semanas posteriores al inicio de la enfermedad. El principal tratamiento para los casos de hepatitis B crónica es interferón (interferón  $\alpha$ -2b o interferón A) e interferón pegilado  $\alpha$ -2a (Pegasys), así como medicamentos antivirales como telbivudina (Tyzeka), entecavir (Baraclude), lamivudina (Epivir-VHB) y dipivoxilo de adefovir (Hepsera). El tratamiento principal para los casos de hepatitis C crónica es antivirales e interferón o compuesto de interferón, como interferón pegilado  $\alpha$ -2a e interferón pegilado  $\alpha$ -2b en combinación con el fármaco antiviral ribavirina. Hoy en día, no existe un medicamento eficaz para tratar el daño hepático causado por el virus.

**[0007]** La IL-22, también conocida como factor inducible derivado de células T relacionado con la interleucina-10 (IL-TIF), es una glucoproteína secretada por las células T. La expresión de ARNm de IL-22 se demostró originalmente en líneas de células T estimuladas con IL-9, líneas de mastocitos estimuladas con IL-9, así como células de bazo activadas con concanavalina A de ratón. El ARNm de IL-22 humano se expresa principalmente en células T periféricas aisladas y son estimuladas por anticuerpo anti-CD-3 o ConA. El ARNm de IL-22 también se expresa en las células NK estimuladas. Las células T activadas son principalmente células CD4 +, especialmente células Th1 a través de la vía CD28.

**[0008]** El precursor de IL-22 está compuesto por 179 residuos de aminoácidos (el péptido maduro está compuesto por 146 restos de aminoácidos). Dumoutier informó primero de las secuencias de ADN de IL-22 de ratón y humano clonados (Dumoutier, y col., JI 164: 1814-1819, 2000). Además, Dumoutier poseía las patentes relacionadas con IL-22 (US 6.359.117 y US 6.274.710), mientras que Gurney poseía la patente relacionada con el uso de IL-22 en el tratamiento de la enfermedad pancreática humana (US 6.551.799).

**[0009]** La IL-22 se expresa principalmente en el timo, el cerebro, las células T activadas y los mastocitos, las células de bazo estimuladas por lectina (Duroutier JI 2002), las células NK estimuladas por interleucina-2/interleuquina-12

(Wolk, KJI 2002) ), y en una serie de órganos y tejidos, incluyendo intestino, hígado, estómago, riñón, pulmón, corazón, timo, bazo, con estimulación de LPS (papel Dumoutier PNAS), en el que se puede medir un aumento de la expresión de IL-22 en aquellos órganos y tejidos.

5 **[0010]** IL-22 expresa su función biológica a través de la combinación del receptor IL-22R1 y el receptor IL-10R2. IL-22R1 es un receptor específico de IL-22 y se expresa en la piel, los riñones, el sistema digestivo (páncreas, intestino delgado, hígado, intestino grueso, colon) y el sistema respiratorio (pulmón, bronquios). Se ha publicado la investigación sobre IL-22 como agente regulador del sistema inmune.

10 **[0011]** El uso médico de IL-22 en la reducción de triglicéridos séricos y la obesidad se ha informado en solicitudes de patentes relacionadas con los usos médicos de IL-22 (véase WO 2006/073 508 y CN 200510023103.0). El uso médico de los monómeros de IL-22 en el tratamiento de la hepatitis viral se ha descrito en aplicaciones relacionadas con pantallas genéticas para la predicción del resultado de la infección viral (véase WO 2002/029098) y medicamentos para el tratamiento de la enfermedad hepática (véase CN 101 218 254).

15 **[0012]** Sin embargo, todavía no se ha descubierto que los dímeros de IL-22 humana puedan desempeñar un papel activo en el tratamiento de la hepatitis viral.

### RESUMEN DE LA INVENCION

20 **[0013]** A la luz de los antecedentes precedentes, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un fármaco alternativo para el tratamiento de hepatitis viral con una eficacia mejorada y el uso de los mismos, es decir, el uso de dímero de interleuquina-22 humana (IL-22) en el tratamiento de la hepatitis viral en mamíferos.

25 **[0014]** De acuerdo con esto, la presente invención, en un aspecto, proporciona el uso de un dímero de IL-22 humana en la fabricación de un fármaco para tratar la hepatitis viral.

**[0015]** En una realización ejemplar de la presente invención, la hepatitis viral comprende hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D y hepatitis E.

30 **[0016]** En otra realización a modo de ejemplo, el dímero IL-22 humano se muestra como la fórmula (I):



35 donde

M1 es un primer monómero de IL-22 humana;

M2 es un segundo monómero de IL-22 humana; y

40 L es un enlazador que conecta el primer monómero y el segundo monómero y está dispuesto entre ellos, en el que el dímero de IL-22 conserva la actividad biológica de IL-22 y tiene una vida media en suero de al menos dos veces la vida media del primer o del segundo monómero.

**[0017]** En una realización ejemplar de la presente invención, el enlazador L se selecciona del grupo que consiste en:

- 45 i). un péptido corto que comprende de 3 a 50 aminoácidos; y  
ii). un polipéptido de fórmula (II):



50 donde

Y es una proteína transportadora;

Z es nulo, o un péptido corto que comprende de 1 a 30 aminoácidos;

55 "-" es un enlace químico o un enlace covalente.

**[0018]** En otra realización ejemplar, el primer monómero y el segundo monómero son de la misma entidad.

60 **[0019]** En otra realización ejemplar, el primer monómero y el segundo monómero son de las diferentes entidades.

**[0020]** En una realización ejemplar, la actividad biológica incluye:

- 65 (a). Reducir la posibilidad de inflamación hepática y necrosis hepatocelular y proteger las células hepáticas del daño causado por el virus de la hepatitis; y

(b). inhibir el aumento de ALT/AST causado por el virus de la hepatitis.

**[0021]** En otra realización ejemplar, la proteína transportadora se forma por la conexión de dos fragmentos Fc de IgG a través de un enlace disulfuro. En otra realización ejemplar, hay 2-4 enlaces disulfuro entre los dos fragmentos Fc.

**[0022]** En otra realización ejemplar, la proteína transportadora es albúmina o fragmento Fc de IgG humana.

**[0023]** En otra realización a modo de ejemplo, "-" es un enlace peptídico.

**[0024]** En una realización ejemplar, la semivida en suero del dímero de IL-22 es al menos tres, cinco o diez veces mayor que la vida media del primer y/o el segundo monómero.

**[0025]** En otra realización a modo de ejemplo, el dímero IL-22 es un dímero formado por monómeros en los que el monómero comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-5.

**[0026]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un dímero de IL-22 humana de fórmula (I):

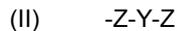


donde

M1 es un primer monómero de IL-22 humana;

M2 es un segundo monómero de IL-22 humano; y

L es un enlazador que conecta el primer monómero de IL-22 humana y el segundo monómero de IL-22 humana y está dispuesto entre ellos, en donde dicho enlazador L es un polipéptido de fórmula (II):



donde

Y es una proteína transportadora;

Z es un péptido corto que comprende de 1 a 30 aminoácidos;

"-" es un enlace químico o un enlace covalente;

en el que el dímero de IL-22 conserva la actividad biológica de IL-22 y tiene una vida media en suero de al menos el doble de la vida media del primer o el segundo monómero de IL-22 humana; en el que la proteína transportadora se forma por la conexión de dos fragmentos Fc de IgG2 humana a través de enlaces de disulfuro; y en el que cada uno de los fragmentos Fc consiste en los restos de aminoácidos 163-385 de la SEQ ID NO: 2.

**[0027]** En el tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la hepatitis viral, que comprende un dímero de IL-22 humana, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que dicho dímero de IL-22 se muestra como de fórmula (I).



donde

M1 es un primer monómero de IL-22 humana;

M2 es un segundo monómero de IL-22 humano; y

L es un enlazador que conecta el primer monómero y el segundo monómero y está dispuesto entre ellos, en el que el dímero de IL-22 retiene la actividad biológica de IL-22 y tiene una vida media en suero de al menos el doble de la vida media de dicho primer o dicho segundo monómero de IL-22 humana.

**[0028]** También se describe un dímero de IL-22 humano de fórmula (I):



donde

M1 es un primer monómero de IL-22 humana;

5 M2 es un segundo monómero de IL-22 humana; y

L es un enlazador que conecta el primer monómero y el segundo monómero y está dispuesto entre ellos, en el que el dímero de IL-22 conserva la actividad biológica de IL-22 y tiene una vida media en suero de al menos dos veces la vida media del primer o del segundo monómero.

10 **[0029]** También se describe una composición farmacéutica para tratar hepatitis viral, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un dímero de IL-22 humana de fórmula (I):



15 donde

M1 es un primer monómero de IL-22 humana;

20 M2 es un segundo monómero de IL-22 humana; y

L es un enlazador que conecta el primer monómero y el segundo monómero y está dispuesto entre ellos, en el que el dímero de IL-22 conserva la actividad biológica de IL-22 y tiene una vida media en suero de al menos dos veces la vida media del primer o del segundo monómero.

25 **[0030]** En otra realización a modo de ejemplo, el dímero de IL-22 es un dímero formado por monómeros en los que el monómero comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3 y 5.

30 **[0031]** Un método para preparar dímero de IL-22 comprende los pasos de:

a) transformar células de mamífero con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica un complejo de IL-22-Fc;

35 b) cultivar las células de mamífero transformadas; y

c) aislar y purificar el dímero de IL-22 obtenido de la etapa (b).

40 **[0032]** Es claro para un experto en la técnica que las características técnicas mencionadas anteriormente y discutidas en los ejemplos a continuación de la presente invención podrían combinarse entre sí para dar como resultado una solución técnica nueva o incluso mejor.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 **[0033]**

La Fig. 1 ilustra la estructura de un dímero de IL-22 de la presente invención en el que "-" representa el enlazador y el objeto de forma ovalada marcado con "IL-22" representa un monómero de IL-22.

50 En una realización específica, la secuencia de aminoácidos del dímero de IL-22 se muestra en la SEQ ID NO: 1 en la que los residuos de amino 1-146 representan IL-22, los residuos de amino 147-162 representan el enlazador, y los residuos 163-308 representan otro IL-22.

Las Figs. 2A y 2B ilustran la estructura de un dímero de IL-22 de la presente invención en la que "-" representa el enlazador de aminoácidos y el objeto de forma ovalada marcado con "IL-22" representa un monómero de IL-22.

55 El objeto de forma ovalada marcado con "C" representa una proteína transportadora en la que el monómero de IL-22 está dispuesto en el extremo N-terminal de la proteína transportadora. El acoplamiento de dos fragmentos Fc a través de un enlace disulfuro también se muestra en la Fig. 2B.

60 La secuencia de aminoácidos de un monómero de IL-22 con fragmentos de Fc, que se usa para formar el dímero de IL-22 de esta realización, se muestra en la SEQ ID NO: 2 en la que los residuos de amino 1-146 representan un IL-22, residuos de amino 147-162 representan el enlazador, y los residuos 163-385 representan el fragmento Fc de IgG2 humana. Un dímero de IL-22 está formado por dos monómeros de IL-22 con fragmentos de Fc mediante el acoplamiento de los fragmentos de Fc.

65 La secuencia de aminoácidos de un monómero IL-22 con fragmentos Fc, que se usa para formar el dímero de IL-22 de esta realización, se muestra en la SEQ ID NO: 3 en la que los residuos de amino 1-146 representan un IL-22, los residuos de amino 147-152 representan el enlazador, y los residuos 153-375 representan el fragmento Fc de IgG2 humana. Un dímero de IL-22 está formado por dos monómeros de IL-22 con fragmentos de Fc mediante

el acoplamiento de los fragmentos de Fc.

Las Figs. 3A y 3B ilustran la estructura de un dímero de IL-22 de la presente invención en la que "-" representa el enlazador de aminoácidos, el objeto de forma ovalada marcado con "IL-22" representa un monómero de IL-22, el objeto en forma de óvalo de etiqueta marcado con "C" representa una proteína transportadora en la que el monómero de IL-22 está dispuesto en el extremo C de la proteína transportadora. El acoplamiento de dos fragmentos de Fc a través de un enlace de disulfuro también se muestra en la Fig. 3B.

La secuencia de aminoácidos de un monómero de IL-22 con fragmentos de Fc, que se usa para formar el dímero de IL-22 de esta forma de realización, se muestra en la SEQ ID NO: 4 en la que los residuos de aminoácidos 1-223 representan el fragmento Fc de la IgG2 humana, los residuos de aminoácidos 224-239 representan el enlazador, y los residuos 240-385 representan una IL-22. Un dímero de IL-22 está formado por dos monómeros de IL-22 con fragmentos de Fc mediante el acoplamiento de los fragmentos de Fc.

La secuencia de aminoácidos de un monómero de IL-22 con fragmentos Fc, que se usa para formar el dímero de IL-22 de esta realización, se muestra en la SEQ ID NO: 5 en la que los residuos de amino 1-233 representan el fragmento Fc de IgG2 humana, los residuos de amino 224-229 representan el enlazador, y los residuos 230-375 representan un IL-22. Un dímero de IL-22 está formado por dos monómeros de IL-22 con fragmentos de Fc mediante el acoplamiento de los fragmentos de Fc.

La Fig. 4 muestra el efecto del dímero de IL-22 e IL-22 (IL-22-Fc) sobre hígado estimulante de STAT3 de ratones. El resultado ilustró que la bioactividad de estimulación del dímero de IL-22 era obviamente más alta que la bioactividad de estimulación de IL-22.

La Fig. 5 muestra el cambio en los niveles de ALT en suero de los ratones infectados con el virus de la hepatitis. El monómero de IL-22 humana recombinante (IL-22, IL-22 pegilado) y el dímero de IL-22 mostraron inhibir la elevación de los niveles de ALT causados por el virus de la hepatitis, en los que el efecto inhibitor del dímero de IL-22 es particularmente significativo.

La Fig. 6 muestra el cambio en los niveles de AST en suero de los ratones infectados con el virus de la hepatitis. Se demostró que el monómero de IL-22 humana recombinante (IL-22, IL-22 pegilado) y el dímero de IL-22 obviamente inhibe la elevación de los niveles de AST causados por el virus de la hepatitis, en los que el efecto inhibitor del dímero de IL-22 es particularmente significativo.

La Fig. 7 muestra los cambios morfológicos de la histología hepática de los ratones infectados con el virus de la hepatitis. Cinco días después de la infección de los ratones con virus MHV-A59, se observó una inflamación grave del tejido hepático, necrosis celular y cambios morfológicos anormales. Tras el tratamiento con IL-22 o su dímero, la morfología de la histología hepática de los animales fue obviamente protegida, con una disminución significativa de la inflamación y la necrosis celular.

La Fig. 8 muestra los resultados del análisis sobre la bioactividad in vitro del dímero de IL-22 y el monómero IL-22.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

[0034] Tras un estudio extenso y en profundidad, los inventores han descubierto, por primera vez en la historia, que el dímero de IL-22 humana tiene un efecto terapéutico significativo en la hepatitis inducida por virus. IL-22 se muestra para proteger eficazmente las funciones del hígado y reducir significativamente la elevación de la sangre ALT/AST causada por el virus. Además, en comparación con el monómero IL-22, se muestra que el dímero de IL-22 prolonga la vida media in vivo, mejora las propiedades farmacocinéticas del fármaco, reduce la frecuencia de inyección; especialmente, se ha demostrado que potencia la actividad in vivo de forma significativa y, por lo tanto, puede tratar la hepatitis viral de manera más eficaz. Esta invención se hizo en base a este descubrimiento.

### Términos

[0035] El término "esencialmente la misma secuencia de aminoácidos" significa que la secuencia de aminoácidos es idéntica; o que dentro de la secuencia de aminoácidos, hay un cambio en uno o más residuos de aminoácidos (falta, adición o reemplazo de uno o más residuos), y dicho cambio esencialmente no disminuiría la actividad biológica de los mismos, en la que la secuencia de aminoácidos todavía puede expresar su función biológica al unirse a los receptores de IL-22 en las células diana. Cualquier IL-22 "esencialmente la misma", bien glicosilada (derivada del sistema de expresión natural o eucariótico) o no glicosilada (derivada del sistema de expresión procarionota o sintetizada químicamente), está dentro del alcance de la presente invención.

[0036] El término "terapia" se refiere a la administración de IL-22 a un sujeto que lo necesite con el fin de curar, mejorar, reducir o afectar la enfermedad, el síntoma o la predisposición del sujeto.

[0037] El término "sujeto" se refiere a ratones, humanos u otros mamíferos.

[0038] El término "dosis terapéuticamente efectiva" se refiere a una dosis de IL-22 que puede alcanzar el objetivo del tratamiento dentro del sujeto que lo necesita. Un experto en la técnica debe entender que "dosis terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo de las vías de administración, los tipos de excipientes usados y la combinación con otros medicamentos.

5

#### IL-22 y el método de preparación de los mismos

[0039] El término "Interleucina-22" o "IL-22" se refiere a una proteína, que (a) tiene esencialmente la misma secuencia de aminoácidos que la IL-22 humana/murina como se describe por Dumoutier et al. en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.359.117 y (b) la misma actividad biológica que la IL-22 natural. La IL-22 de la presente invención incluye, pero no se limita a IL-22 humana, IL-22 humana recombinante. También se describen IL-22 murina y/o IL-22 murina recombinante.

10

[0040] "IL-22" también incluye IL-22 pegilada y proteínas IL-22 modificadas covalentemente. Por ejemplo, la IL-22 en la presente invención se puede polimerizar mediante la modificación con cualquier polietilenglicol (PEG) activado con un peso molecular de 5.000-100.000 con el fin de prolongar su tiempo de semivida. Los protocolos detallados se pueden consultar en Greenwald et al., Bioorg. Med.Chem. Lett. 1994, 4, 2465; Caliceti y col., IL Farmaco, 1993, 48, 919; Zalipsky y Lee, Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, Plenus Press, Nueva York (1992). Se prefiere PEG ramificado de múltiples brazos (CN ZL02101672.0, WO9932139, PCT/US95/0755, PCT/US94/13013, patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192, 4.179.337).

15

20

[0041] La IL-22 de la presente invención se expresa por tecnología de recombinación génica. La célula huésped expresada incluye célula procariota, levadura o célula eucariota superior. La célula huésped procariota adecuada incluye, pero sin limitación, bacterias G<sup>+</sup> o G<sup>-</sup>, tales como E. coli. Las cepas de E. coli disponibles públicamente incluyen K12 MM294 (ATCC 31.446), X1776 (ATCC 31.537), W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635), etc. Otras células procariotas adecuadas incluyen, pero no se limitan a Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, como *Salmonella typhimurium*, Serratia como *Serratia marcescans*, Shigella, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, Pseudomonas como *P. aeruginosa* y Streptomyces. Se prefiere E. coli W3110 ya que a menudo se usa como la célula huésped para el producto de ADN recombinante.

25

30

[0042] Además de las células procariotas, las células eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras también son adecuadas para la expresión o clonación de IL-22 de la presente invención. Saccharomyces es un microorganismo huésped eucariota inferior común. Otras células hospedadoras incluyen Schizosaccharomyces pombe (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139 383); Huéspedes de kluyveromyces (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.943.529; Flee et al., Bio/Technology, 9: 968 - 975 (1991)); tales como *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 154 (2): 737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans*, *K. marxianus*; yarrowia (documento EP 402.226); *Pichia Pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna y otros, J. Basic Microbiol., 28: 265 - 278 [1988]); Candida; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 76: 5259 - 5263 [1979]); Schwanniomycetes tales como *Schwanniomycetes occidentalis* (EP 394, 538); hongos filamentosos tales como Neurospora, Penicillium, Tolypocladium (WO 91/00357), Aspergillus tales como *A. nidulans* (Balance y col., Biochem. Biophys. Res. Commum., 112: 284-289 [1983]; Tilburm et al., Gene, 26: 205-221 [1983], Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly e Hynes, EMBO J., 4: 475 - 479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas también se pueden usar para expresar la IL-22 de la presente invención, que incluyen pero no se limitan a diversos tipos de levadura que pueden crecer en metanol tales como Hansenula, Candida, Klöckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis, Rhodotorula. El metilotropo típico se puede encontrar en C. Anthony, The biochemistry of Methylotrrophs, 269 (1982).

35

40

45

50

[0043] Las células hospedadoras usadas para expresar IL-22 de la presente invención se derivan principalmente de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen insectos tales como Drosophila S2 y Spodoptera Sf9, y células de plantas. Las células mamíferas adecuadas incluyen células COS de ovario de hámster chino (CHO); en particular, línea celular CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea celular de riñón de embrión humano 293 (Graham y col., J. Gen Virol., 36:59 (1997)); CHO/-DHFR (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 4216 (1980)); células trofoblásticas de testículo murino (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243 - 251) (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); células de cáncer de mama murino (MMT 060562, ATCC CCL51). Una de las habilidades ordinarias en el arte debe ser consciente de cómo seleccionar las células anfitrionas adecuadas.

55

60

[0044] Las células hospedadoras mencionadas anteriormente pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales después de transformadas o transfectadas con vector de expresión o vector de clonación de IL-22. El medio nutriente anteriormente mencionado, después de la modificación, es adecuado para inducir promotor, seleccionar transformante o amplificar la secuencia codificante de IL-22. Las condiciones para la nutrición tales como la selección de los medios nutrientes, la temperatura y el pH son claras para una persona con habilidades normales en la técnica. Para los principios generales para optimizar la proliferación de células cultivadas, protocolos y técnicas de los mismos, véase Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press,

65

1991) y Sambrook et. al., supra.

**[0045]** El método de transfección de células eucarióticas y células procariontas transformadoras sería evidente para un experto en la materia, tal como el método de usar cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), precipitación con fosfato de calcio, lipofectamina o electroporación. Un experto en la materia podría seleccionar el método adecuado dependiendo de las diferentes células huésped utilizadas. Por ejemplo, el método de usar  $\text{CaCl}_2$  (Sambrook et al., Supra) o la electroporación es generalmente adecuada para células eucarióticas; *Agrobacterium tumefaciens* se usa principalmente para transformar células vegetales (Shaw et al., Gene, 23: 315 (1983) y WO 89/05859); la precipitación con fosfato de calcio puede usarse para aquellas células de mamífero sin paredes celulares (Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978)). Para una descripción exhaustiva del método para la transfección de células de mamífero, véase la Patente de los Estados Unidos N° 4.399.216. Para técnicas de transfección de levadura, véase Van Solingen y col., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 76: 3829 (1979). En la presente divulgación se pueden usar otras técnicas para introducir ADN en células, tales como microinyección de ácido nucleico, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policoniaciones tales como polibreno, poliornitina, etc. Para diversas técnicas que pueden usarse para transformar células de mamífero, véase Keown et al., Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) y Mansour et al., Nature, 336: 348-352 (1988).

**[0046]** La secuencia de nucleótidos que codifica IL-22 de la presente invención se puede insertar en un vector replicable para la clonación de genes o la expresión de proteínas. Todos los vectores, como el plásmido, el cósmido, el virión o el bacteriófago están a disposición del público. Con el uso de técnicas comunes en este campo, un experto en la técnica puede insertar la secuencia de nucleótidos que codifica IL-22 en sitios de endonucleasa de restricción apropiados. Un vector replicable generalmente incluye, entre otros, las siguientes partes: una o más secuencias de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. Con el uso de técnicas de ligación estándar en este campo, un experto en la técnica puede construir un vector replicable apropiado que incluye una o más partes anteriores.

**[0047]** La IL-22 de la presente invención no solo puede expresarse directamente a través de ADN recombinante, sino que también puede producirse a través de la fusión de polipéptidos heterólogos. Éstos pueden ser una secuencia de señal localizada en una proteína madura o un extremo N del polipéptido, y también puede ser otros fragmentos polipeptídicos con sitios de digestión específicos localizados en una proteína madura o un N-terminal del polipéptido. Usualmente, la secuencia de señal es parte del vector replicable anterior, o parte de la secuencia de nucleótidos que codifica IL-22 de la presente descripción insertada en un vector replicable. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procarionta, tal como fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o la secuencia líder de enterotoxina II termoestable. En la secreción de levadura, la secuencia de señal puede ser una secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder de factor  $\alpha$  (que incluye la secuencia líder de factor de *Saccharomyces* o levadura *Kluyveromyces*, véase la Patente de Estados Unidos N° 5.010.182) o la secuencia líder de fosfatasa ácida, secuencia líder de glucosa amilasa de *C. albicans* (EP 362.179). En el sistema de expresión de mamíferos, la secuencia de señal de mamífero puede usarse directamente para secretar la proteína diana. Dicha secuencia incluye una secuencia de señal derivada de la misma especie o similar de mamíferos y una secuencia líder de secreción del virus.

**[0048]** Tanto el vector de expresión como el vector de clonación tienen una porción de secuencia de nucleótidos, que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras correspondientes. Las secuencias nucleotídicas correspondientes con los hospedadores de bacterias, levaduras o virus son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias G, el origen de la replicación de 2.mu. El plásmido es adecuado para levaduras, mientras que el origen de replicación de virus (SV40, virus del polyoma, adenovirus, VSV o BPV) es adecuado para clonar vectores en células de mamíferos.

**[0049]** Tanto el vector de expresión como el vector de clonación tienen una parte del gen de selección, también denominado marcador de selección. La proteína típica expresada mediante la selección del gen es (a) resistente a algunos antibióticos tales como ampicilina, neomicina, metotrexato, tetraciclina, etc., o toxina; (b) capaz de remediar las deficiencias auxotróficas; y (c) suplementaria a algunos factores nutrientes clave, tales como la secuencia de codificación de racemasa de alanina D que necesitan los huéspedes del bacilo, que no pueden ser proporcionados por medios complejos.

**[0050]** El gen de selección adecuado para células hospedadoras de mamífero debería ser capaz de distinguir las células hospedadoras que pueden aceptar el gen que codifica IL-22 de la presente divulgación, tal como DHFR o quinasa de timidina. La célula hospedadora adecuada que usa DHFR de tipo salvaje como gen de selección es cepa CHO sin actividad de DHFR. El método de preparación y cultivo de esta cepa se puede ver en Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 4216 (1980). El gen de selección adecuado para células de levadura es el gen *trp1* expresado en el plásmido de levadura *Yrp7* (Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7: 141 (1979); Tschemperet y col., Gene, 10: 157 (1980)). El gen *trp1* puede usarse para cribar una cepa de mutación de levadura que no puede crecer con triptófano, como ATCC N° 44047 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)).

**[0051]** Tanto el vector de expresión como el vector de clon generalmente incluyen un promotor que puede ligarse manualmente a la secuencia de nucleótidos que codifica IL-22 de la presente invención, para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores correspondientes a todo tipo de huéspedes son conocidos por los expertos en la técnica. Los promotores adecuados para hospedadores procarióticos incluyen el sistema promotor de  $\beta$ -lactamasa y lactosa (Chang et al., *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281: 544 (1979)), fosfatasa alcalina y sistema de promotor trp. (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980); EP 36.776), hetero-promotor tal como el promotor tac (deBoer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 80: 21-25 (1983)). El promotor de huésped bacteriano también incluye una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) que se puede ligar manualmente a la secuencia de nucleótidos que codifica IL-22 de la presente invención.

**[0052]** Los promotores adecuados para levadura huésped incluyen promotor de cinasa 3-fosfoglicérica (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 (1980)) u otros promotores de enzima glucolítica (Hess y col., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900 (1978)), como la enolasa, deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato, hexoquinasa, piruvato des-carboxilasa, quinasa de fructosa, isomerasa de glucosa-6-fosfato, mutasa de trifosfoglicerato, quinasa de piruvato, isomerasa de fosfato de triosa, isomerasa de fosfato de glucosa y quinasa de glucosa.

**[0053]** Algunos otros promotores de levadura inducibles pueden regular la transcripción de acuerdo con diferentes condiciones de crecimiento, incluyendo promotores para deshidrogenasa de alcohol 2, isociatocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes relacionadas con la degradación de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato, enzimas degradantes de maltosa y galactosa. La descripción detallada de vectores y promotores adecuados para el sistema de expresión de levadura se puede ver en el documento EP 73.657.

**[0054]** Los promotores pueden controlar la transcripción de secuencia del gen de IL-22 de la presente descripción en el vector replicable en células huésped de mamífero. Estos promotores incluyen los de cierta genoma viral tales como virus de polio, virus de viruela aviar (UK 2.211.504), adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B, o SV40; los de mamíferos extraños, como promotor de  $\beta$ -actina o promotor de inmunoglobulina; y los de promotor de la proteína de choque térmico. Sin embargo, estos promotores deben ser compatibles con el sistema de expresión del huésped.

**[0055]** La transcripción de la secuencia de nucleótidos codificante IL-22 de la presente descripción en sistema de expresión eucariótica se puede mejorar a través de la inserción de potenciador en los vectores replicables. El potenciador es un tipo de elemento que actúa en cis de la molécula de ADN y es por lo general de la longitud de 10-300bp, que puede mejorar la transcripción de moléculas de ADN actuando sobre los promotores. Actualmente, se sabe que hay una serie de potenciadores que tienen origen en genes de mamíferos (haptoglobina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Los potenciadores más ampliamente utilizados son células virales de eucariota, tales como potenciador de SV 40 (100-270 pb) en el lado tardío del origen, potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, potenciador del virus polio en el lado tardío del origen, y el potenciador de adenovirus. Los potenciadores pueden ser insertados en el extremo 5' o 3' terminal de la IL-22 que codifica la secuencia de la presente descripción en los vectores replicables, pero se prefiere el terminal 5'.

**[0056]** Los vectores de expresión en células eucariotas huésped (células de levadura, células de hongos, células de insecto, células vegetales, células animales, células humanas, u otras células nucleadas de otros organismos multicelulares) también incluyen la secuencia de nucleótidos para la terminación de la transcripción y la estabilización del ARNm. Este tipo de secuencia se deriva generalmente de la 5' terminal de la región no traducida en células eucariotas, el ADN viral o ADNc, y a veces se deriva de la 3' terminal. La secuencia de nucleótidos dentro "de la región no traducida" se puede transcribir como secuencia poliA acilada en la región no traducida de IL-22 de la presente descripción.

**[0057]** Otros procedimientos, vectores y células huésped para la síntesis de la IL-22 de la presente descripción en sistema de cultivo de vertebrados recombinantes se puede ver en Gething y otros, *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei y otros, *Nature*, 281: 40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058.

#### Dímero IL-22

**[0058]** La estructura del dímero IL-22 de la presente invención se muestra en la fórmula I. Las Figs. 1-3 ilustran la estructura representativa del dímero IL-22 de la presente invención, en la que la proteína de vehículo incluye, pero no se limita al fragmento Fc de la IgG humana (1, 2, 3, 4), o albúmina humana.

**[0059]** IL-22 puede ser localizada en el extremo C-terminal o N-terminal de la proteína portadora.

**[0060]** Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, "enlazador" se refiere a un péptido corto que conecta los dos monómeros IL-22 y se dispone entre los mismos. No hay ninguna restricción especial sobre la longitud del enlazador. Un enlazador es generalmente de 5-50 residuos de aminoácidos de longitud. En general, un enlazador no afecta o afecta significativamente el pliegue apropiado y conformación formada por la configuración de los dos monómeros IL-22. Los ejemplos de engarce incluyen, pero no se limitan a:

**[0061]** En una realización preferida adicional, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a). una secuencia de aminoácidos con 3-16 residuos de aminoácidos formada por aminoácidos hidrófobos de glicina (Gly) o prolina (Pro), tal como Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro;

(b). una secuencia de aminoácidos codificada por múltiples sitios de clonación. Tal secuencia por lo general contiene 5-20 residuos de aminoácidos; en una realización preferida, dicha secuencia contiene 10-20 residuos de aminoácidos;

(c). una secuencia de aminoácidos que comprende proteína no de IL-22 de monómero, tal como una secuencia de aminoácidos de IgG o albúmina; y

(d). una secuencia de aminoácidos que comprende cualquier combinación de (a), (b), y (c) anterior.

**[0062]** En una realización preferida, el enlazador tiene la secuencia de GSGGGSGGGGSGGGGS (es decir, 147-162 residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y ASTKGP (es decir, 147-152 residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 3).

**[0063]** Además, una secuencia de aminoácidos que no afecta la actividad biológica de IL-22 de monómero se puede añadir a la N-terminal o C-terminal de la proteína de fusión. En una realización preferida, tal secuencia de aminoácidos adjunta es beneficiosa para la expresión (por ejemplo, péptido de señal), la purificación (por ejemplo, secuencia 6 x Su, el sitio de escisión de *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$  - factor de péptido de señal (Glu-Lys-Arg)), o la mejora de la actividad biológica de la proteína de fusión.

#### **Método de preparación de dímero**

**[0064]** La codificación de las secuencias de ADN del dímero de IL-22 o la proteína de fusión de la presente invención puede sintetizarse completamente artificialmente. Alternativamente, las secuencias de ADN codificada del primer monómero IL-22 y/o el segundo monómero de IL-22 pueden obtenerse mediante amplificación por PCR o la síntesis y luego se unieron entre sí para formar la secuencia de ADN codificada del dímero o proteína de fusión de IL-22 de la presente invención.

**[0065]** Con el fin de mejorar el volumen de expresión de las células huésped, la modificación se puede realizar en la secuencia codificada de dímero de IL-22. Por ejemplo, el sesgo de codones de las células huésped se puede utilizar para eliminar secuencias que no son beneficiosas para la transcripción y la traducción. En la presente descripción, el sesgo de codones de las células de levadura o células de mamífero se puede utilizar en combinación con el software de ADN para la detección de genes de IL-22 de dímero a fin de eliminar secuencias que no son beneficiosas para la transcripción y la traducción. Las secuencias eliminadas pueden ser sitio de corte de intrón, secuencia de terminación de la transcripción, etc.

**[0066]** Después de obtenerse la secuencia de ADN codificada de la proteína de fusión novedosa de la presente invención, primero se inserta en un vehículo de expresión apropiado, seguido de una célula huésped apropiada. Por último, la célula huésped transformada se cultiva y se purifica para obtener la proteína de fusión novedosa de la presente invención.

**[0067]** Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, "vehículo" se refiere a un plásmido, cósmido, vector de expresión vector de clonación, vector virus, etc.

**[0068]** En la presente descripción, portadores conocidos en la técnica, tales como portadores disponibles en el mercado, pueden ser utilizados. Por ejemplo, con el uso del soporte obtenido en el mercado, la secuencia codificada de nucleótidos de la nueva proteína de fusión de la presente invención está conectada operativamente a la secuencia de la expresión y el control para formar el portador de expresión de proteína.

**[0069]** Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, "conectado operativamente" se refiere a un escenario de que algunas partes de una secuencia de ADN lineal pueden afectar a la actividad biológica de otras partes de la misma secuencia de ADN lineal. Por ejemplo, si se utiliza una señal de ADN como la expresión de un precursor y participa en la secreción de polipéptidos, el ADN de señal (secuencia líder de la secreción) es "conectado operativamente" a los polipéptidos. Si un promotor controla la transcripción de secuencia, el promotor está "conectado operativamente" a la secuencia codificada. Si un sitio de unión al ribosoma está situado en una posición en la que se hace posible la traducción, el sitio de unión a ribosoma está "conectado operativamente" a la secuencia codificada. En general, "conectado operativamente" significa que los residuos en cuestión son de proximidad; para la secuencia líder de secreción, "conectado operativamente" se refiere a la proximidad dentro del marco de lectura.

**[0070]** Como se usa en el presente documento, "células huésped" se refiere tanto a células procariontas como células

eucariotas. Células huésped procariontas usadas comúnmente incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, etc. Células huésped eucariotas comúnmente usadas incluyen células de levadura, células de insectos y células de mamíferos, etc. En un aspecto preferido, las células huésped utilizadas son células eucariotas; En otro aspecto preferido, las células huésped utilizadas son células de mamíferos.

5 [0071] Después de obtenerse las células huésped transformadas, que pueden ser cultivadas en un medio ambiente adecuado para expresar la proteína de fusión de la presente invención para expresar la proteína de fusión. A continuación, se separa la proteína de fusión expresada.

#### 10 Composición farmacéutica y método de administración de la misma

[0072] Puesto que el dímero de IL-22 de la presente invención puede generar una señal de activación del receptor más fuerte y tiene una excelente vida media en suero, el dímero de IL-22 y una composición farmacéutica que comprende el dímero de IL-22 como el ingrediente activo principal se puede utilizar para el tratamiento de la hepatitis viral. En una realización preferida, la hepatitis viral comprende: hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D y hepatitis E.

[0073] La composición farmacéutica de la presente invención comprende una cantidad segura y eficaz del dímero IL-22 de la presente invención y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. "Cantidad segura y eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar significativamente la condición del paciente en necesidad del mismo, sin causar efectos secundarios graves. En general, la composición farmacéutica comprende 0,001-1,000 mg de IL-22 o su dímero por dosis; en una realización preferida, la composición farmacéutica comprende 0,05-300 mg de IL-22 o su dímero por dosis; en una realización preferida adicional, la composición farmacéutica comprende 0,5-200 mg de IL-22 o su dímero por dosis.

[0074] "Excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material de relleno o gelatina sólida o líquida con uno o más tipos de compatibilidades que es adecuado para ser utilizado en humanos con suficiente pureza y una toxicidad suficientemente baja. "Compatibilidad" se refiere a la capacidad de cada ingrediente de la composición para mezclarse mutuamente con el compuesto de la presente invención y la capacidad de combinar mutuamente entre los mismos, sin disminuir sustancialmente la eficacia clínica del compuesto. Algunos de los ejemplos de excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptables incluyen celulosa y sus derivados (por ejemplo carboximetilcelulosa, etilcelulosa de sodio, acetato de celulosa, etc.), gelatina, esteatita, agente lubricante sólido (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio), sulfato de calcio, aceite vegetal (por ejemplo, aceite de guisantes, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, etc.), polioles (por ejemplo propilenglicol, glicerol, manitol, sorbitol, etc.), emulsionante (por ejemplo, Tween®), agente humectante (por ejemplo, sulfato de laurilo sódico), colorante, agente aromatizante, estabilizador, antioxidante, antiséptico, agua libre de pirógenos, etc.

[0075] La vía de administración de IL-22 o su dímero de la presente invención comprende la administración oral, administración rectal, administración parenteral (intravenosa, intramuscular, o subcutánea), y administración parcial.

[0076] Forma sólida para la administración oral comprende cápsulas, tabletas, píldoras, polvos, y gránulos. En estas formas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos uno de los excipientes convencionalmente inertes (o vehículos), tales como citrato de sodio, fosfato dicálcico, o cualquiera de los siguientes ingredientes: (a) agente de presentación o de aumento de volumen, por ejemplo, almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; (b) agente de adhesión, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginato, gelatina, polivinilpirrolidona, sucrosa, y acacia; (c) humectantes, por ejemplo glicerol; (d) agente de desintegración, por ejemplo, agar, carbonato de calcio, almidón de patata o almidón de yuca, ácido algínico, silicato de compuesto, y carbonato de sodio; (e) agente de tampón, por ejemplo, cera de parafina; (f) la absorción de agente de aceleración, por ejemplo el compuesto de amina cuaternaria; (g) un agente humectante, por ejemplo, cetanol y monoestearato de glicerina; (h) absorbentes, por ejemplo bolus alba; y (i) lubricantes, por ejemplo esteatita, estearato de calcio, estearato de sodio, polietilenglicol sólido, laurilsulfato de sodio, o cualquier mezcla de los mismos. Cápsulas, comprimidos y píldoras también pueden comprender agente de tamponamiento.

[0077] La forma sólida tal como tabletas, píldoras de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimiento y materiales de core-shell, tales como tubería de revestimiento y otros materiales conocidos en la técnica. Estos materiales comprenden agente opacificante y el compuesto activo o compuesto en la composición que puede ser liberado de una manera retardada en una parte determinada del tubo digestivo. El componente de incrustación tal como materiales poliméricos y materiales de cera se puede utilizar. Si es necesario, los compuestos activos se pueden mezclar con uno o más de los excipientes descritos anteriormente para formular una forma de micro cápsula.

[0078] La forma líquida para la administración oral comprende emulsión farmacéuticamente aceptable, solución, suspensión, jarabe o tintura. Aparte de compuestos activos, la forma líquida también comprende diluyentes inertes utilizados convencionalmente en la técnica tales como agua u otro disolvente, agente solubilizante y emulsionante tal como etanol, isopropanol, acetato de carbonato, acetato de etilo, propan-2-ol, 1,3-butan -2-ol, dimetilformamida, y aceite; en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de embrión de maíz, aceite de oliva,

aceite de ricino y aceite de sésamo, o cualquiera de sus mezclas.

**[0079]** Aparte de los diluyentes inertes, el compuesto también puede comprender aditivos, tales como agente humectante, agente emulsionante, agente de suspensión, agente edulcorante, correctores, y especias.

**[0080]** Además de los compuestos activos, la suspensión puede comprender también un agente de suspensión, tales como alcohol isoesteárico de etoxilo, sorbitol de polioxietileno, sorbitán, celulosa de microcristalina, metóxido de aluminio, agar, o cualquier mezcla de los mismos.

**[0081]** Los compuestos utilizados para la administración parenteral también pueden comprender agua fisiológicamente aceptable estéril o solución anhidra, solución de dispersión, suspensión, o emulsión, y polvo estéril que puede ser re-disuelto en una solución inyectable estéril o una solución de dispersión. Portadores hidratados o anhidros adecuados, agente de dilución, disolvente o excipiente comprende agua, etanol, polioles, y mezclas adecuadas de los mismos.

**[0082]** Formas del dímero IL-22 de la presente invención utilizadas para la administración parcial comprenden ungüento, polvo, parche, rociador, y inhalante. En condiciones estériles, los componentes activos se pueden mezclar con un vehículo fisiológicamente aceptable y cualesquiera antisépticos, agentes de tamponamiento; si es necesario, los componentes activos se pueden mezclar con el propulsor.

**[0083]** El dímero de IL-22 de la presente invención puede ser únicamente administrado o ser administrado en conjunción con cualquiera de los compuestos farmacéuticamente aceptables.

**[0084]** La micro-cápsula que contiene IL-22 o su dímero de la presente invención se puede utilizar como un sistema de liberación sostenida. El sistema de micro-cápsula de liberación sostenida de la proteína recombinante se ha aplicado con éxito a rhGH, rhIFN, IL-2 y MNrgp120 (Johnson et al, Nat Med, 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed Ther 27: 1221-1223 (1993); WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399;. Patente de EE.UU. N° 5.654.010).

**[0085]** El sistema de liberación sostenida de IL-22 o su dímero de la presente invención se pueden preparar con PLGA que tiene buena compatibilidad biológica y degradabilidad. El ácido láctico y ácido glicólico, los productos degradantes de PLGA, se pueden borrar rápidamente en el cuerpo humano. Además, la degradabilidad de que el polímero puede variar de varios meses a varios años dependiendo de su peso molecular y la composición (Lewis, "Controlled release of bioactive agents form lactide/glycolide polymer", en: M. Chasin y R. Langer (eds), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker:. Nueva York, 1990), pp.1-41)).

**[0086]** La dosificación y la concentración de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden ajustar según la situación real. Un experto en la técnica debería saber cómo elegir los medios de dosificación y de inyección adecuados de acuerdo con las necesidades prácticas. El principio para el ajuste entre las diferentes especies tales como ratones y humanos se puede ver en Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al.; Pergamon Press, Nueva York, 1989, pp.42-96.

**[0087]** En el uso de la composición farmacéutica, una cantidad segura y eficaz del dímero IL-22 de la presente invención se administra a un mamífero (por ejemplo, ser humano) en necesidad del mismo, en el que la dosis administrada es una dosis de administración efectiva farmacéuticamente aceptable. Para un humano de 60 kg, la dosis de administración es generalmente 0,01-300 mg; en una realización preferida, la dosis de administración es 0,5-100 mg. En la determinación de la dosis real, factores conocidos en la técnica tales como la vía de administración, la condición de los pacientes, etc. tienen que ser considerados.

**[0088]** Hay muchas ventajas de la presente invención incluyendo pero no limitado a lo siguiente:

1. IL-22 o su dímero se ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la hepatitis viral en modelos animales.
2. Dímero de IL-22 puede prolongar la vida media *in vivo*, mejorar las propiedades farmacocinéticas del fármaco del mismo, reducir la frecuencia de inyección, y mejorar significativamente la bioactividad *in vivo*.
3. En relación molar de IL-22 igual, también se muestra el dímero de IL-22 para exhibir señal de activación más fuerte *in vivo* de STAT3 en comparación con monómero de IL-22, mejorando de este modo el efecto terapéutico.

**[0089]** Los siguientes ejemplos de realización describen adicionalmente la presente invención. Aunque la descripción se refiere a realizaciones particulares, será evidente para un experto en la técnica que la presente invención puede ponerse en práctica con la variación de estos detalles específicos. Por lo tanto esta invención no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. Además, para las realizaciones en las que no se describen detalles de los métodos experimentales, tales métodos se llevan a cabo de acuerdo con condiciones convencionales, tales como los descritos en Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 1989), o sugeridos por los fabricantes.

**Ejemplo 1**

**[0090]** El dímero de IL-22 con la estructura descrita en las Figs. 1-3 se prepara y purifica por métodos convencionales. SEQ ID NO: 1 representa dímero de IL-22 y SEQ ID NOs: 2-5 representan monómero de IL-22.

**Ejemplo 2 - Semivida *in vivo* de dímero de IL-22**

**[0091]** Las ratas recibieron una única inyección subcutánea de dímero de IL-22 (que está formada por dos monómeros IL-22 de la SEQ ID NO: 2) con una dosificación de 100 mg/kg. Los parámetros farmacocinéticos (n = 6) se calcularon y se enumeraron en la Tabla 1 a continuación. La vida media *in vivo* de monómero de IL-22 en ratas es de aproximadamente 1,3 horas.

Parámetro	Unidad	Valor Promedio	DE
AUC <sub>(0-t)</sub>	ng/mL * h	4216,7	638,3
MRT <sub>(0-t)</sub>	h	22,6	1,6
t <sub>(1/2)</sub>	h	7,8	1,3
Clz/F	L/h/kg	0,028	0,003
C <sub>max</sub>	ng/mL	153,2	26,2

**Ejemplo 3 - Efecto de IL-22 o su dímero en pSTAT3 de hígado de ratones**

**[0092]** Se ensayaron 52 ratones normales ICR en que la mitad eran hombres con peso de 20-22 g. Los ratones se dividieron en 13 grupos de 4 ratones por grupo. Un grupo de ratones fue sacrificado antes de la administración del fármaco y los tejidos del hígado fueron retirados y almacenados en nitrógeno líquido para la determinación del nivel básico de fosforilación de STAT3 (pSTAT3) del hígado. 6 grupos de ratones recibieron inyección subcutánea única de IL-22 recombinante a una dosis de 40 mg/kg; mientras que otros 6 grupos de ratones recibieron inyección subcutánea única de dosis equimolares de dímero de IL-22 recombinante en dosis de 100 µg/kg (el dímero de IL-22 estaba formado por dos monómeros de IL-22-Fc con una secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 4, en el que la IL-22 en un mol del dímero se calcula como 2 moles). Después de la inyección, el tejido del hígado se retiró, respectivamente, en la 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 48<sup>a</sup>, 72<sup>a</sup> hora y se almacenó en nitrógeno líquido. Entonces homogeneizado de tejido hepático fue preparado y se determinó el contenido de proteína del mismo. El nivel de pSTAT3 se detectó por el método ELISA (STAT3 [pY705] fósforo ELISA Kit, Invitrogen Corporation).

**[0093]** Como se muestra en la Fig. 4, la inyección de IL-22 (40 mg/kg) en ratones normales puede aumentar significativamente el nivel de hígado pSTAT3 en la que el nivel estaba en el máximo a alrededor de la segunda hora y se reanuda al nivel básico en la 8<sup>a</sup> hora. La inyección de dímero de IL-22 (100 µg/kg), a una dosis equimolar de IL-22, en ratones normales pueden aumentar significativamente el nivel de hígado pSTAT3, en la que el nivel alcanzó un máximo alrededor de la 24<sup>a</sup> hora, se mantuvo relativamente alta en la 48<sup>a</sup> hora, y, básicamente, se recuperó hasta el nivel básico a la 72<sup>a</sup> hora.

**[0094]** Como se ilustra por el resultado mencionado anteriormente, tanto el dímero de IL-22 como IL-22 puede activar la actividad biológica de la transducción de señales y activador del factor de transcripción 3 (STAT3).

**[0095]** Merece la pena observar que, en dosis equimolar de IL-22, la actividad biológica del dímero de IL-22 fue significativamente mejor que la actividad biológica del monómero de IL-22.

**Ejemplo 4 - Efecto de IL-22 o su dímero en el tratamiento de la hepatitis inducida por el virus en ratones**

**[0096]** 50 ratones hembra C57/BL de 6-8 semanas se dividieron en 5 grupos con 10 ratones por grupo. Se inyectaron por vía intraperitoneal cuatro grupos de ratones con virus MHV-A59 a una dosis de 2X10<sup>4</sup> pfu por ratón. Preparación y titulación de MHV-A59 se pueden referir en Chin J Clin Pharmacol Ther 2005, 10(11): 1253. 2 horas después de la inyección de virus, el grupo de tratamiento recibió una inyección subcutánea con IL-22 humana recombinante a una dosis de 100 µg/kg una vez cada día; o con IL-22 pegilada a una dosis de 100 µg/kg una vez cada dos días; o con dímero recombinante de IL-22 (proteína de fusión IL-22-IgG-Fc) (el dímero de IL-22 estaba formado por dos monómeros de IL-22-Fc con una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que la IL-22 en un mol del dímero se calcula como 2 moles) a una dosis de 100 µg/kg una vez cada dos días. El grupo de IL-22 humana recombinante recibió un total de 5 inyecciones, mientras que el grupo IL-22 pegilado humano y el grupo de tratamiento de dímero recombinante humano IL-22 recibieron respectivamente un total de 3 inyecciones. El grupo de control negativo 1 incluía ratones hembra C57/BL normales y el grupo de control negativo 2 incluyó ratones infectados de virus MHV-A59 que recibieron inyección de vehículo disolvente (suero de ratón al 0,5%, PBS, pH 7,0). Antes de la inyección de virus, dos animales se tomaron de cada grupo y 100 µL de sangre se recogió de la órbita para la determinación de ALT, los niveles de AST como la línea de base. 3 días y 5 días después de la infección de virus MHV-A59, las muestras de sangre se recogieron de cada grupo para la determinación de ALT, los niveles de AST. En el quinto día, 2% pentobarbital fue utilizado para anestesiarse a los animales y los hígados se separaron y se fijaron con formalina al 4% para la biopsia y tinción de HE.

[0097] Como se muestra en las Figs. 5-7, la inyección diaria de monómero de IL-22 humana recombinante (IL-22 o IL-22 pegilado) y dímero de IL-22 pueden suprimir el aumento de multi-plegaje de ALT/AST causada por el virus de la hepatitis, reducir la posibilidad de inflamación de hígado y necrosis hepatocelular, y proteger las células hepáticas contra el daño causado por el virus de la hepatitis.

[0098] Merece la pena observar que, en dosis equimolar convertida de IL-22, el efecto terapéutico es dímero de IL-22 > IL-22 pegilado > IL-22. En otras palabras, el efecto terapéutico sobre la hepatitis viral en ratones inyectados con dímero de IL-22 no sólo era mucho mejor que el grupo de animales inyectados con monómero de IL-22, pero también es mejor que el grupo de animales inyectados con monómero de IL-22 pegilado con una semivida más larga. Por lo tanto, el efecto terapéutico de dímero de IL-22 era significativamente mejor que el monómero de IL-22 y IL-22 pegilado. La relación de peso molecular de proteína de monómero de IL-22 o IL-22 pegilada a dímero de IL-22 es de aproximadamente 1: 5. Por lo tanto, bajo la condición de que la dosis de administración molar molecular de IL-22 es menor que la de IL-22 o IL-22 pegilado, el dímero de IL-22 mostró un efecto terapéutico más significativo.

### 50 **Ejemplo 5 - Formación de dímero de IL-22 por el complejo de IL-22-Fc**

#### a. Construcción de la línea celular de expresión de dímero de IL-22

[0099] Las secuencias de ADNc que codifican complejos de IL-22-Fc (como se muestra en la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7, en que SEQ ID NO: 6 codifica el monómero se muestra en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 codifica el monómero mostrado en la SEQ ID NO: 3) se sintetizaron. La secuencia de ADNc de monómero de IL-22 humana fue conectada con la secuencia de ADNc de fragmentos de IgG2 Fc. El sitio EcoRI y los componentes requeridos para la expresión de células de mamíferos tales como secuencia de Kozak y el péptido de señal de secuencia se introdujeron en el extremo 5', mientras que el sitio de XbaI se introdujo en el extremo 3'. Se clonó en un plásmido pUC19 comercialmente disponible y nombrado como pil-22-Fc, y se transformó en *E. coli* TG1. El plásmido de pUC19 fue digerido por EcoRI y XbaI, y aproximadamente 1300bp de fragmento de IL-22-Fc se cosecharon y se conectaron con plásmido pcDNA3 de expresión digerida de EcoRI y XbaI (Invitrogen) para construir el plásmido de expresión pEX-IL-22-Fc. Plásmido de pEX-IL-22-Fc de expresión se linealizó y se transfectó en células CHO para expresar dímero de IL-22. El nivel de expresión se detectó por el método y líneas celulares de ELISA con un rendimiento más alto de proteína se seleccionaron y se preparó la biblioteca de células.

#### b. La separación y purificación del dímero de IL-22

[0100] Las células CHO recombinantes se cultivaron por el método convencional para expresar la proteína recombinante. Después del cultivo celular, se recogió el sobrenadante de células (que contiene complejos de IL-22, dímero de IL-22s, multímeros de IL-22 y metabolitos). El sobrenadante recogido se filtró y se purificó por una serie de métodos de cromatografía. Por ejemplo, fue capturado por Proteína A Sefarosa FF (GE Healthcare, cat n° 17-1279-04), y se eluyó con un tampón de citrato 20-50 mM y 0,1 - 2 M de NaCl a pH 3,5-3,8 para obtener dímero de IL-22 de pureza superior al 90%, entonces el siguiente paso se llevó a cabo mediante el uso de cromatografía PPA de modo mixto (Pall Life Sciences Cat n°: k364-01) y la proteína diana se eluyó con una solución tampón de 20-50 mM NaAc/HAC en pH 3,0-5,0. En este proceso, bajo la inactivación de pH y filtración de membrana de Nano 20 se utilizaron para la eliminación viral. Se obtiene finalmente el dímero de IL-22.

[0101] La pureza del dímero de IL-22 purificado era mayor que 95% (usando análisis de HPLC en fase inversa). Como se ilustra por la electroforesis, el peso molecular del dímero de IL-22 purificado (formado por dos monómeros que se muestran en SEQ ID NO: 2) fue de  $52 \pm 10$  KD (utilizando el análisis de SDS-PAGE reducido) que se correspondía con el valor predicho. La longitud de onda máxima de absorción UV es 280 nm. Los dímeros de IL-22 pueden estimular células Colo205 para producir IL-10 *in vitro*. (ED50 es 10-1000 ng/mL)

### 50 **Ejemplo 6 - Farmacocinética dímero de IL-22 en monos rhesus**

[0102] 8 monos rhesus adultos sanos en que la mitad de ellos eran hombres con el peso de 3-5 kg se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de acuerdo con el peso del animal. Los grupos fueron tratados con dímero de IL-22 a una dosis de 30 o 100 µg/kg en la que cada grupo de tratamiento tuvo 4 animales, la mitad de ellos eran hombres. Cada grupo recibió una inyección subcutánea de la dosis correspondiente del dímero IL-22 (formado por dos monómeros se muestran en SEQ ID NO: 2) en el volumen de administración de 0,2 ml/kg de peso corporal en la administración única. 0,6 mL de sangre se recogió a las venas safenas de la extremidad inferior antes de la administración y en la media, 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 48<sup>a</sup>, 72<sup>a</sup>, 96<sup>a</sup>, 120<sup>a</sup>, 144<sup>a</sup>, 168<sup>a</sup> hora después de la administración y tras mantenerse a temperatura ambiente durante 30 min, se separó el suero y se detectó la concentración de dímero de suero de IL-22 usando un kit de ELISA (Biolegend, Cat n° 434507). Los parámetros farmacocinéticos se analizaron usando un modelo no compartimental en los resultados detectados, y los resultados se muestran en la Tabla 1. En la semivida *in vivo* (t<sub>1/2z</sub>) de IL-22 es de aproximadamente 2 horas.

Tabla 1 - Parámetros farmacocinéticos (media  $\pm$  DE, n = 4)

Dosis	AUC (0 - t) mg/L * h	MRT (0 - t) h	t1/2z h	Tmax h	CLz/F mL/h/kg	Cmax ng/ml
30 $\mu$ g/kg	11,92 $\pm$ 0,91	50,5 $\pm$ 5	63,3 $\pm$ 38,9	17 $\pm$ 9,5	2 $\pm$ 1	172,3 $\pm$ 17,1
100 $\mu$ g/kg	39,9 $\pm$ 6,2	51,1 $\pm$ 4,7	65,6 $\pm$ 10,9	24 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0	506,9 $\pm$ 115,7

**Ejemplo 7 - Análisis de bioactividad *in vitro* de dímero de IL-22 e IL-22**

**[0103]** Las células Colo205 se cultivaron en RPMI1640 medio de FBS al 10% y las células se cultivaron hasta la fase logarítmica. El sobrenadante se desechó y se añadió PBS para lavar el medio de cultivo de distancia residual, seguido de la adición de 2 ~ 5 mL de 0,25% de tripsina-EDTA para la digestión. A continuación se añadió el medio y se mezcló hasta la uniformidad. La mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min y se recogió y se preparó en 5,0 X 10<sup>5</sup> células/ml de suspensión celular con medio básico. La suspensión se añadió en los pocillos de la placa de 96 pocillos (100  $\mu$ L/pocillo) y se mantuvo durante la noche a 37°C, en 5% CO<sub>2</sub> incubador. Al día siguiente, la placa de 96 pocillos se retiró del incubador de CO<sub>2</sub> y se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, 90  $\mu$ L de sobrenadante de células se retira de cada pocillo y se añadió con 90  $\mu$ L de 0,1% de BSA/RPMI1640, seguido de la adición de dímero de IL-22 (formado por dos monómeros se muestran en SEQ ID NO: 2) a la concentración final de 1,4, 4,1, 12,3, 37,0, 111,1, 333,3, 1000, 3000ng/mL, IL-22 a la concentración final de 0,01, 0,04, 0,12, 0,37, 1,1, 3,3, 10, 30 ng/mL. La mezcla se incubó durante 20 horas en 5% de incubador de CO<sub>2</sub> y sobrenadante celular se recogió y el valor de OD se ensayó usando el kit IL-22 ELISA (I+D ' Cat n° S1000B). Como se muestra en la Fig. 8, el valor de ED50 del dímero de IL-22 es 229ng/mL (2675pM) y la de IL-22 es 0,54ng/mL (32,4pM).

**[0104]** Como se muestra en los resultados anteriores, aunque la bioactividad *in vitro* de IL-22 es ligeramente mejor que la del dímero IL-22, parámetros farmacocinéticos *in vivo* y efecto del dímero IL-22 son mejores que los de IL-22. Por lo tanto, modelos deben ser utilizados *in vivo* para evaluar la actividad biológica de dímero de IL-22.

**[0105]** Aunque la descripción se refirió a realizaciones particulares, será evidente para un experto en la técnica que la presente invención puede ponerse en práctica con la variación de estos detalles específicos.

Listado de secuencias

**[0106]**

<110> GENERON (SHANGHAI) CORPORATION LTD.

<120> USO DE LA INTERLEUCINA-22 EN EL TRATAMIENTO DE HEPATITIS VIRAL

<130> P2011-0360

<150> CN 201010268320.7

<151> 2010-08-31

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 308

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> características\_misc

<223> dímero de IL-22

<400> 1

ES 2 658 309 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50

55

60

65

ES 2 658 309 T3

5 Cys Ile Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
145 150 155 160

10 Gly Ser Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe  
165 170 175

15 Gln Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala  
180 185 190

20 Ser Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu  
195 200 205

25 Phe His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val  
210 215 220

30 Leu Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe  
225 230 235 240

35 Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn  
245 250 255

40 Arg Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg  
260 265 270

45 Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly  
275 280 285

50 Glu Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg  
290 295 300

Asn Ala Cys Ile  
305

55 <210> 2  
<211> 385  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<221> características\_misc  
<223> IL-22 monómero con el fragmento Fc  
<400> 2

65

ES 2 658 309 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 Cys Ile Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
145 150 155 160

55 Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro  
165 170 175

60 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
180 185 190

65 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
195 200 205

70 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
210 215 220

75 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val  
225 230 235 240

80 Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
245 250 255

85 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys  
260 265 270

90 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
275 280 285

ES 2 658 309 T3

5 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
290 295 300

10 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
305 310 315 320

15 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu  
325 330 335

20 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
340 345 350

25 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
355 360 365

30 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
370 375 380

35 Lys  
385

35 <210> 3  
<211> 375  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<221> características\_misc  
<223> IL-22 monómero con el fragmento Fc

45 <400> 3

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

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

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

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

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

80 Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg Leu

ES 2 658 309 T3

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

ES 2 658 309 T3

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

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

15 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
370 375

20 <210> 4  
<211> 385  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<221> características\_misc  
<223> IL-22 monómero con el fragmento Fc

30 <400> 4

35 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
1 5 10 15

40 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
20 25 30

45 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
35 40 45

50 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
50 55 60

55 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
65 70 75 80

60 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
85 90 95

65 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
100 105 110

70 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
115 120 125

75 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
130 135 140

80 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
145 150 155 160

ES 2 658 309 T3

5 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
165 170 175

10 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
180 185 190

15 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
195 200 205

20 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly  
210 215 220

25 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala  
225 230 235 240

30 Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln Gln Pro  
245 250 255

35 Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu Ala  
260 265 270

40 Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe His Gly  
275 280 285

45 Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn Phe  
290 295 300

50 Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln Pro Tyr  
305 310 315 320

55 Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg Leu Ser  
325 330 335

60 Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn Val Gln  
340 345 350

65 Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile Lys  
355 360 365

Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys  
370 375 380

Ile  
385

ES 2 658 309 T3

<210> 5  
 <211> 375  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> características\_misc  
 <223> IL-22 monómero con el fragmento Fc  
 10

<400> 5

15 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
 1 5 10

20 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 20 25 30

25 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 35 40 45

30 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 50 55 60

35 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Thr Phe Arg Val Val Ser  
 65 70 75 80

40 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 85 90 95

45 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 100 105 110

50 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 115 120 125

55 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 130 135 140

60 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 145 150 155 160

65 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
 165 170 175

70 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 180 185 190

75 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 195 200 205

80 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala

ES 2 658 309 T3

	210		215		220														
5	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys			
	225					230					235					240			
10	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala			
				245						250					255				
15	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly			
				260					265					270					
20	Glu	Lys	Leu	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met			
			275					280					285						
25	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser			
		290					295					300							
30	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg			
	305					310					315					320			
35	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His			
				325						330					335				
40	Ile	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly			
				340					345					350					
45	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met			
			355					360					365						
50	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Ile												
	370						375												

50 <210> 6  
 <211> 1278  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <221> características\_misc  
 <223> Secuencia de ADN que codifica IL-22 monómero con el fragmento Fc

60 <400> 6

65

ES 2 658 309 T3

5 gaattcccca gacctatggc cgccttcagc aaatctgtga gctctttcct tatggggacc 60  
ctggccacca gctgcctcct tctcttggcc ctcttgggtac agggaggagc agctgcgccc 120  
atcagctccc actgcaggct tgacaagtcc aacttccagc agccctatat caccaacogc 180  
10 accttcatgc tggctaagga ggctagcttg gctgataaca acacagacgt tcgtctcatt 240  
ggggagaaac tgttccacgg agtcagtatg agtgagcgct gctatctgat gaagcagggtg 300  
15 ctgaacttca cccttgaaga agtgctgttc cctcaatctg ataggttcca gccttatatg 360  
caggagggtg tgccttcctt gccaggetc agcaacaggc taagcacatg tcatattgaa 420  
ggatgatgacc tgcatatcca gaggaatgtg caaaagctga aggacacagt gaaaaagctt 480  
20 ggagagagtg gagagatcaa agcaattgga gaactggatt tgctgtttat gtctctgaga 540  
aatgcctgca ttggatccgg tggcggttcc ggtggaggcg gaagcggcgg tggaggatca 600  
25 gtcgagtgc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 660  
ccaaaaccca aggacacctt catgatctcc cggacccttg aggtcacgtg cgtggtgggtg 720  
gacgtgagcc acgaagacct cgaggtccag ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggtg 780  
30 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 840  
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 900  
aaciaaagcc tcccagcctc catcgagaaa accatctcca aaaccaagg gcagccccga 960  
35 gaaccacagg tgtacacctt gcccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1020  
ctgacctgcc tgggtcaaag cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1080  
40 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1140  
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1200  
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1260  
45 ccgggtaaat gatctaga 1278

50 <210> 7  
<211> 1248  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<221> características\_misc  
<223> Secuencia de ADN que codifica IL-22 monómero con el fragmento Fc

60 <400> 7

65

ES 2 658 309 T3

	gaattcccca gacctatggc cgcacctgcag aaatctgtga gctctttcct tatggggacc	60
5	ctggccacca gctgcctcct tctcttggcc ctcttggtac agggaggagc agctgcgccc	120
	atcagctccc actgcaggct tgacaagtcc aacttccagc agccctatat caccaaccgc	180
10	accttcatgc tggctaagga ggctagcttg gctgataaca acacagacgt tcttctcatt	240
	gggagaaaac tgttccacgg agtcagtatg agtgagcgct gctatctgat gaagcaggtg	300
	ctgaacttca cccttgaaga agtgctgttc cctcaatctg ataggttcca gccttatatg	360
15	caggagggtg tgcccttctt ggcaggttc agcaacaggc taagcacatg tcatattgaa	420
	ggtgatgacc tgcatatcca gaggaatgtg caaaagctga aggacacagt gaaaaagctt	480
20	ggagagagtg gagagatcaa agcaattgga gaactggatt tgctgtttat gtctctgaga	540
	aatgcctgca ttgccagcac aaagggacca gtcgagtgcc caccgtgcc agcaccacct	600
	gtggcaggac cgtcagttct cctcttcccc caaaaacca aggacacctt catgatctcc	660
25	cggacccttg aggtcacgtg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag	720
	ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc acgggaggag	780
	cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg	840
30	aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccagcctc catcgagaaa	900
	accatctcca aaaccaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc	960
35	cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc	1020
	agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccaca	1080
	cctcccatgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	1140
40	agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac	1200
	cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gatctaga	1248

45

50

55

60

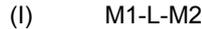
65

**Reivindicaciones**

5 **1.** El uso de un dímero de IL-22 humana en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hepatitis viral.

**2.** El uso de la reivindicación 1 en el que dicho hepatitis viral es la hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, o hepatitis E.

10 **3.** El uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que dicho dímero de IL-22 humana se muestra como la fórmula (I):



15 donde

M1 es un primer monómero de IL-22 humana;  
 M2 es un segundo monómero de IL-22 humana; y  
 L es un ligador que conecta dicho primero monómero de IL-22 humana y dicho segundo monómero de IL-22 humana y dispuesto entre los mismos;  
 20 en el que dicho dímero de IL-22 retiene la actividad biológica de IL-22 y tiene una vida media en suero de al menos dos veces de la vida media de cualquiera de dicho primer o dicho segundo monómero de IL-22 humana.

25 **4.** El uso de la reivindicación 3 en el que dicho enlazador L se selecciona del grupo que consiste en:

- i) un péptido corto que comprende de 3 a 50 aminoácidos; y
- ii) un polipéptido de fórmula (II):



30 donde

Y es una proteína portadora;  
 Z es nulo, o un péptido corto comprende de 1 a 30 aminoácidos; "-" es un enlace químico o un enlace covalente.

**5.** El uso de la reivindicación 3 o la reivindicación 4 en el que dicho primer monómero de IL-22 humana y dicho segundo monómero de IL-22 humana son de la misma entidad.

40 **6.** El uso de la reivindicación 4 o la reivindicación 5 en el que dicha proteína portadora es albúmina o un fragmento Fc de la IgG humana.

**7.** El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 en la que dicho dímero de IL-22 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-5.

45 **8.** El dímero de IL-22 como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento de la hepatitis viral.

50 **9.** El dímero de IL-22 humana en la que dicho dímero se muestra de fórmula (I):



donde

M1 es un primer monómero de IL-22 humana;  
 M2 es un segundo monómero de IL-22 humana; y  
 L es un enlazador que conecta dicho primer monómero de IL-22 humana y dicho segundo monómero de IL-22 humana y dispuesto entre los mismos;  
 60 en el que dicho enlazador L es un polipéptido de fórmula (II):



donde

65 Y es una proteína portadora;  
 Z es un péptido corto que comprende de 1 a 30 aminoácidos;

"-" es un enlace químico o un enlace covalente;

en el que dicha dímero de IL-22 retiene la actividad biológica de IL-22 y tiene una vida media en suero de al menos dos veces de la vida media de cualquiera de dicho primer o dicho segundo monómero de IL-22 humana; en el que la proteína de soporte está formada por la conexión de dos fragmentos Fc de IgG2 humana a través de enlaces de disulfuro; y

en el que cada uno de los fragmentos Fc consisten de residuos de aminoácidos 163-385 de la SEQ ID NO: 2.

**10.** El dímero de IL-22 de la reivindicación 9, en el que el primer monómero de IL-22 humana y el segundo monómero de IL-22 humana comprende residuos de amino 1-146 de la SEQ ID NO: 2.

**11.** El dímero de IL-22 de la reivindicación 9, en el que dicho dímero de IL-22 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-5.

**12.** Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de hepatitis, comprendiendo un dímero de IL-22 humana, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que dicho dímero de IL-22 se muestra como de fórmula (I):



donde

M1 es un primer monómero de IL-22 humana;

M2 es un segundo monómero de IL-22 humana; y

L es un enlazador que conecta dicho primer monómero de IL-22 humana y dicho segundo monómero de IL-22 humana y dispuesto entre los mismos;

y en el que dicho dímero de IL-22 retiene la actividad biológica de IL-22 y tiene una vida media en suero de al menos dos veces de la vida media de cualquiera de dicho primer o dicho segundo monómero de IL-22 humana.

**13.** La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 12 en la que el dímero de IL-22 humana es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-11.

**14.** La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en la que el dímero de IL-22 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-5.

**15.** La composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 12-14, en la que la hepatitis es hepatitis viral.

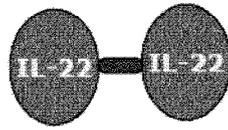


Fig. 1

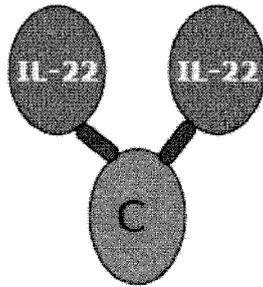


Fig. 2A

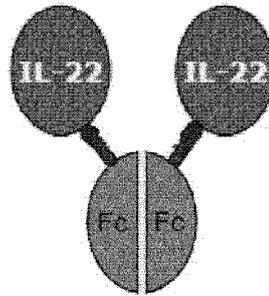


Fig. 2B

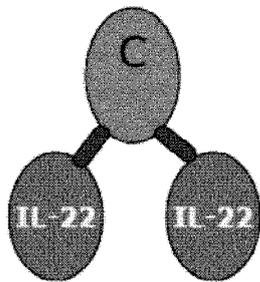


Fig. 3A

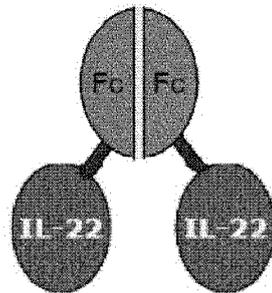


Fig. 3B

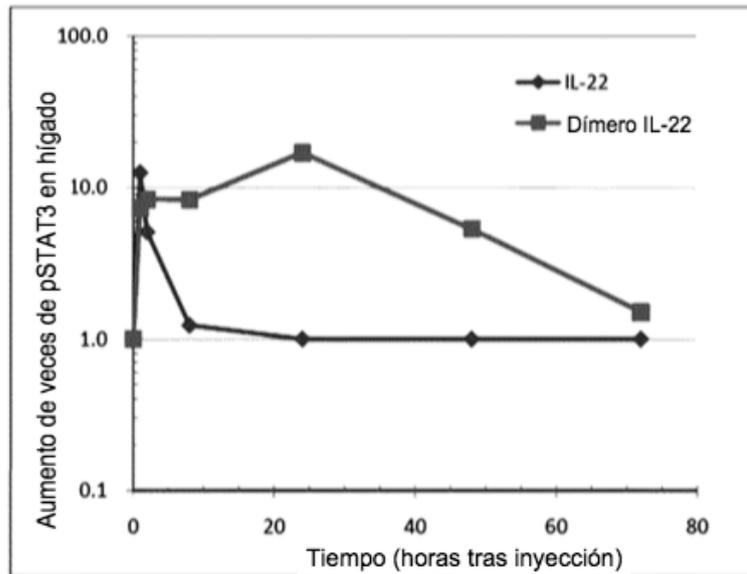


Fig. 4

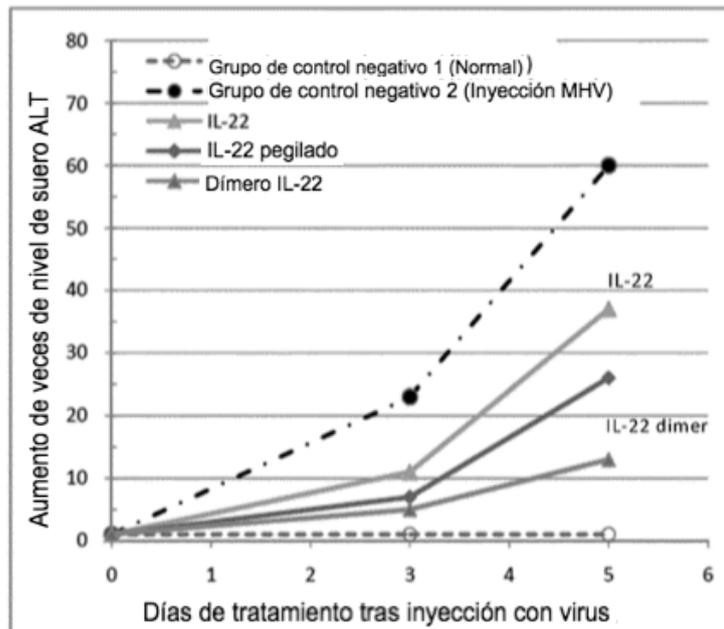


Fig. 5

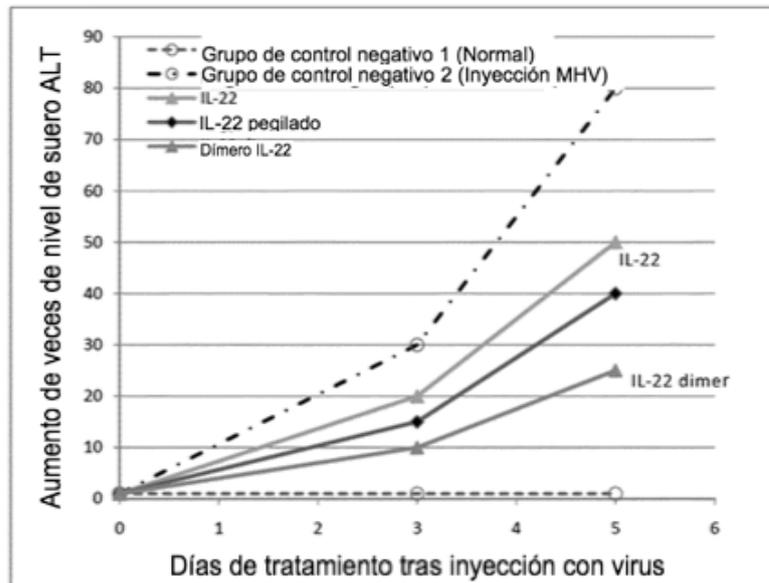
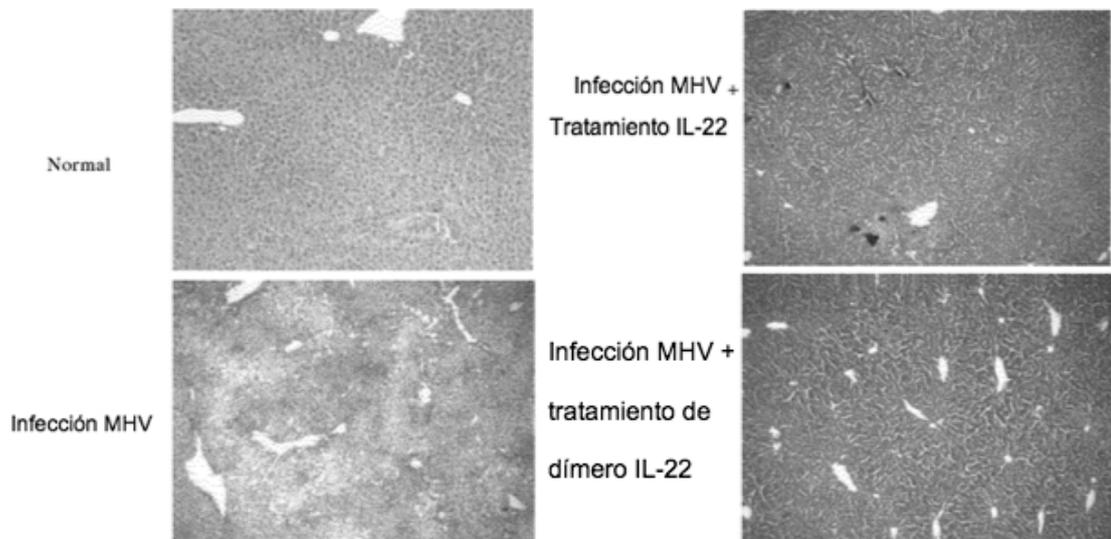


Fig. 6



(Magnificación X200)

Fig. 7

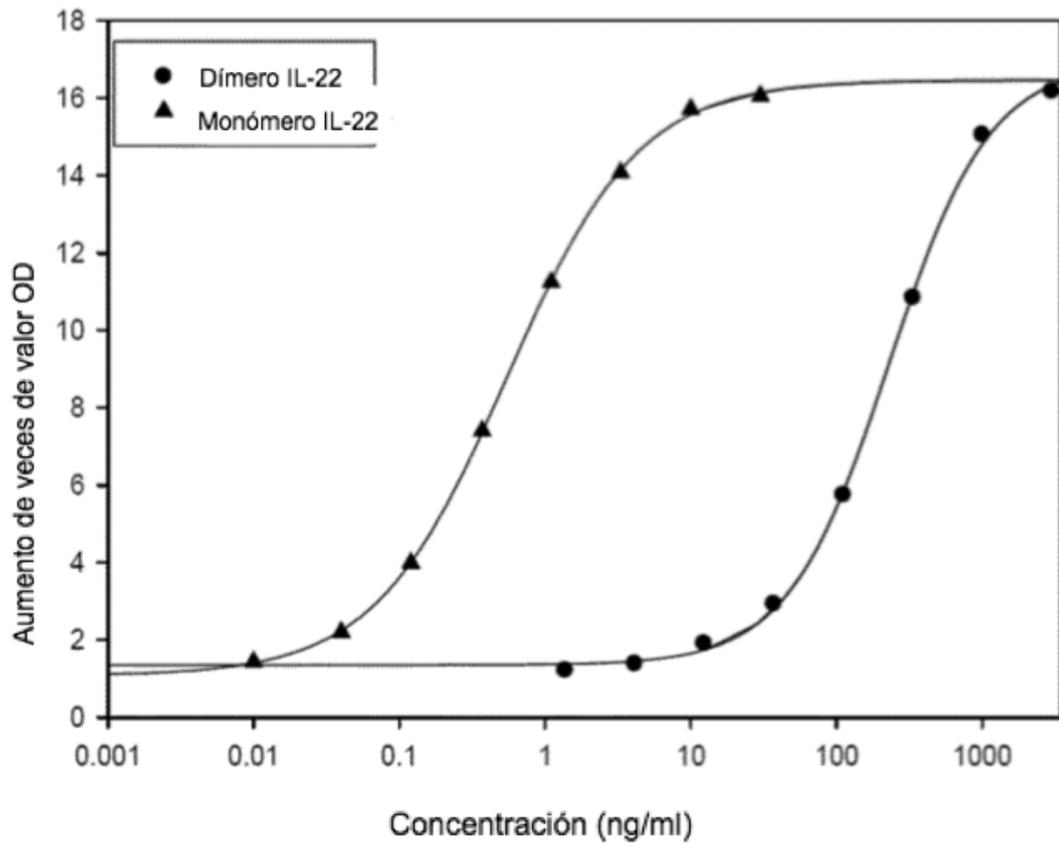


Fig. 8