

CONSTRUCTOS DE SUMINISTRO PARA TRANSCITOSIS Y MÉTODOS

RELACIONADOS

Remisión a Solicitudes Relacionadas

[0001] Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 62/756,889, presentada el 7 de noviembre de 2018, la Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 62/888,133, presentada el 16 de agosto de 2019, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 62/888.238 presentadas el 16 de agosto de 2019, la solicitud internacional PCT/US2019/050708 presentada el 11 de septiembre de 2019 y la solicitud internacional PCT/US2019/021474 presentada el 8 de marzo de 2019, cuyas solicitudes se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

Campo y Antecedentes de la Invención

[0002] El epitelio intestinal ha frustrado los esfuerzos para administrar oralmente grandes moléculas terapéuticas, tal como proteínas, debido a que las proteínas no se pueden difundir a través de la barrera epitelial intacta o cruzar la barrera a través de las uniones estrechas. Una vez captada por una célula epitelial, una proteína terapéutica puede entrar a la ruta destructiva de tráfico lisosómico o se puede liberar de nuevo en el lumen intestinal. Esta incapacidad para que se transporte fácilmente a través del epitelio intestinal puede ser un factor limitante en el desarrollo de formulaciones orales comercialmente viables, en particular para terapias basadas en polipéptidos.

[0003] La administración parenteral tal como administración intravenosa o subcutánea puede ser una solución, pero estas rutas de administración a menudo pueden crear efectos secundarios considerables, disminuyen la eficacia terapéutica, y reducen la conveniencia del

paciente que puede afectar negativamente el cumplimiento. Existe la necesidad de composiciones mejoradas y métodos para transportar agentes terapéuticos a través de un epitelio, por ejemplo, un epitelio intestinal.

[0004] Adicionalmente, la purificación y replegado de los polipéptidos biológicamente activos a fin de obtener polipéptidos correctamente plegados, biológicamente activos, y estables en altos rendimientos y con bajos niveles de endotoxina aún se considera uno de los aspectos más difíciles para una producción rentable y efectiva de recursos de productos terapéuticos biológico (por ejemplo, polipéptidos). Por consiguiente, también existe la necesidad de métodos mejorados para la producción (fermentación, replegado, purificación y formulación) de estas moléculas biológicamente activas.

Breve Descripción de la Invención

[0005] En los diversos aspectos, la presente descripción proporciona un constructo de suministro que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia.

[0006] En los diversos aspectos, la presente descripción proporciona un constructo de suministro que comprende un portador que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9. En algunos casos, el portador se acopla a una carga útil heteróloga. En algunos casos, la carga útil heteróloga es una IL-22 humana. En algunos casos, la IL-22 humana consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11. En algunos casos, el portador se acopla covalentemente a la IL-22. En algunos casos, el portador se acopla covalentemente a la IL-22 mediante un espaciador. En algunas formas de realización, el espaciador consiste

de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13. En algunos casos, el constructo de suministro consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17.

[0007] Se proporciona en la presente un método para tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un constructo de suministro descrito en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17). En algunos casos, la enfermedad inflamatoria es hepatitis, obesidad, enfermedad de hígado graso, inflamación de hígado, o pancreatitis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pouchitis, proctitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto versus hospedador, artritis reumatoide, o psoriasis. En algunos casos, la enfermedad es la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

[0008] Descritos en la presente, en ciertas formas de realización, están métodos para obtener una proteína de fusión purificada que no se presenta naturalmente, el método que comprende: realizar cromatografía de intercambio aniónico en una mezcla que comprende la proteína de fusión que no se presenta naturalmente para obtener una primera fracción que comprende la proteína de fusión que no se presenta naturalmente; en donde la proteína de fusión que no se presenta naturalmente comprende IL-22 y un portador. En algunas formas de realización, en donde realizar la cromatografía de intercambio aniónico comprende la unión de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente a la resina de intercambio aniónico y proporcionar un gradiente incrementada de sal para la elución posterior de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente a fin

de obtener la primera fracción. En algunas formas de realización, realizar la cromatografía de intercambio aniónico comprende poner en contacto la mezcla con una resina que comprende cuentas de polimetacrilato con funcionalidad amina. En algunas formas de realización, la resina es una resina NH₂-750F.

[0009] En algunas formas de realización, el método comprende además replegar la proteína de fusión que no se presenta naturalmente antes de realizar la cromatografía de intercambio aniónico. En algunas formas de realización, replegar la proteína de fusión que no se presenta naturalmente comprende poner en contacto la proteína solubilizada con caótrofo de cuerpos de inclusión con una solución de replegado, en donde la solución de replegado comprende: arginina (0.75 M a 1.25 M); glicerol (2% a 20% v/v); cisteína (0.5 mM a 10 mM); y cistamina (0.2 mM a 10 mM); en donde la solución de replegado tiene un pH de entre 7.5 y 8.5. En algunas formas de realización, la arginina está presente en la solución de replegado en una concentración de entre 0.9 M y 1.1 M; glicerol está presente en la solución de replegado en una concentración de entre 7% y 13% (w/w); cisteína está presente en la solución de replegado en una concentración de entre 1.5 mM y 6 mM; cistamina está presente en la solución de replegado en una concentración de entre 0.6 mM y 3 mM; y la solución de replegado tiene un pH de entre 7.8 y 8.2.

[00010] En algunas formas de realización, el método comprende además someter una muestra que comprende la primera fracción a una resina de hidroxiapatita para obtener una segunda fracción que comprende la proteína de fusión que no se presenta naturalmente. En algunas formas de realización, la resina de hidroxiapatita es una resina de CaPure-hidroxiapatita. En algunas formas de

realización, el método comprende además realizar la cromatografía de intercambio catiónico en una muestra que comprende la primera fracción. En algunas formas de realización, realizar la cromatografía de intercambio catiónico comprende poner en contacto la muestra que comprende la primera fracción con una resina que contiene cuentas de polimetacrilato con funcionalidad sulfato. En algunas formas de realización, la resina es una resina de Sulfate-650F TOYOPEARL.

[00011] En algunas formas de realización, después del contacto con una célula, el portador promueve la endocitosis o transcitosis de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente. En algunas formas de realización, después del contacto con la célula, el portador promueve la transcitosis de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente. En algunas formas de realización, la célula es una célula epitelial intestinal. En algunas formas de realización, la célula epitelial intestinal es una célula epitelial intestinal polarizada. En algunas formas de realización, el portador es una variante truncada de un polipéptido de Cholix que se presenta naturalmente o no naturalmente. En algunas formas de realización, el portador tiene al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 22, o 23. En algunas formas de realización, la proteína de fusión que no se presenta naturalmente tiene al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 14-21. En algunas formas de realización, IL-22 tiene al menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 10, 11, o 12.

[00012] En algunas formas de realización, el portador,

por sí mismo, tiene un primer punto isoeléctrico (pI) y el IL-22, por sí mismo, tiene un segundo punto isoeléctrico, en donde el primer punto isoeléctrico es al menos 1 unidad de pH, al menos 1.5 unidades de pH, al menos 1.7 unidades de pH, o al menos 2 unidades de pH más bajo que el segundo punto isoeléctrico. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el portador tiene un pI de entre 4.8 y 5.4, entre 4.9 y 5.3, entre 5.0 y 5.2, tal como un pI de aproximadamente 5.1. En algunas formas de realización, el pI de la IL-22 está entre aproximadamente 6.8 y 7.4, tal como entre aproximadamente 6.9 y 7.3, entre aproximadamente 7.0 y 7.2, tal como aproximadamente 7.1. En algunas formas de realización, la proteína de fusión que no se presenta naturalmente se obtiene por cualquiera de los métodos descritos en la presente.

[00013] Descritos en la presente, en ciertas formas de realización, están métodos de replegado de una proteína de fusión que no se presenta naturalmente que comprende un portador e IL-22, el método que comprende: (i) poner en contacto cuerpos de inclusión que comprenden la proteína de fusión que no se presenta naturalmente con una solución de solubilización que comprende un agente caótropro para producir una proteína de fusión soluble que no se presenta naturalmente; (iii) poner en contacto la proteína de fusión que no se presenta naturalmente con una solución de replegado, en donde la solución de replegado comprende: arginina (0.75 M a 1.25 M); glicerol (2% a 20% v/v); cisteína (0.5 mM a 10 mM); y cistamina (0.2 mM a 10 mM); en donde la solución de replegado tiene un pH de entre 7.5 y 8.5.

[00014] En algunas formas de realización, la arginina está presente en la solución de replegado en una concentración de entre 0.9 M y 1.1 M; glicerol está

presente en la solución de replegado en una concentración de entre 7% y 13% (w/w); cisteína está presente en la solución de replegado en una concentración de entre 1.5 mM y 6 mM; cistamina está presente en la solución de replegado en una concentración de entre 0.6 mM y 3 mM; y la solución de replegado tiene un pH de entre 7.8 y 8.2.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

[00015] Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente a manera de referencia al mismo grado como si cada publicación individual, patente, o solicitud de patente se indicara de manera específica e individualmente para que se incorpore por referencia.

Breve Descripción de las Figuras

[00016] Las características novedosas de la descripción se exponen con particularidad en las reivindicaciones anexas. Un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente descripción se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que pone formas de realización ilustrativas, en las cuales los principios de la invención se utilizan, y las figuras anexas de las cuales:

[00017] La figura 1 muestra esquemáticamente una configuración que comprende una cámara apical arriba de una monocapa de células epiteliales y una cámara basal debajo de esta monocapa de células epiteliales. Para la permeabilidad apical a basolateral, se aplicaron artículos de prueba (por ejemplo, constructos de suministro, cargas útiles, etc.) al lado apical (A) y la cantidad de material permeado (por ejemplo, sometida a transcitosis) se determinó en el lado basolateral (B).

[00018] La figura 2 muestra que un constructo de suministro con SEQ ID NO: 15), que incluye un portador

(SEQ ID NO: 7) acoplado a una IL-22 (SEQ ID NO: 11) mediante un espaciador (SEQ ID NO: 13), transportaron la carga útil IL-22 a través de las monocapas de células epiteliales intestinales Caco-2, polarizadas, intactas en una manera dependiente de tiempo (la cantidad de proteína en el sitio basolateral se midió 15, 30, y 45 minutos después de que se aplicó el constructo de suministro a la membrana basal de la monocapa como se describe en lo anterior en la figura 1). Los datos muestran además que cuando el constructo de suministro con un portador de SEQ ID NO: 7 e IL-22 (SEQ ID NO: 11) se aplica a las células epiteliales Caco-2, aproximadamente 2-3 veces más IL-22 cruzaron la monocapa de células epiteliales Caco-2 como se compara cuando una IL-22 (SEQ ID NO: 12) no se acopló a un portador.

[00019] La figura 3 muestra que un constructo de suministro con SEQ ID NO: 15) dio por resultado que IL-22 (SEQ ID NO: 11), que se transporta a través de las monocapas de células intestinales SMI-100 intactas y polarizadas en una manera dependiente de tiempo (la cantidad de proteína en la cámara basolateral se midió a 15, 30, y 45 minutos después del que el constructo de suministro se aplicó a la membrana basal de la monocapa). Los datos muestran además que cuando el constructo de suministro que incluye el portador con SEQ ID NO: 7 acoplado a IL-22 (SEQ ID NO: 11) se aplica a células epiteliales, aproximadamente 2-3 veces más IL-22 cruzó la monocapa de células epiteliales SMI-100 como es comparada cuando una IL-22 (SEQ ID NO: 12) no se acopló a un portador.

[00020] La figura 4 demuestra que un primer constructo de suministro (SEQ ID NO: 15) que incluye un portador (SEQ ID NO: 7) acoplado a una IL-22 (SEQ ID NO: 11) mediante un espaciador (SEQ ID NO: 13) da por resultado en IL-22 que se transporta en cantidades significativas a través del

epitelio intestinal intacto y polarizado *in vivo*. El sitio apical del epitelio intestinal se resalta por la flecha blanca #1. La *lamina propria* se abrevia como "l.p.". La membrana basal exterior del epitelio polarizado se resalta por la flecha blanca #2. La localización de IL-22 se indica con la flecha blanca #3).

[00021] La figura 5A demuestra la fosforilación de STAT3 en células murinas FL83 B en función de la concentración de agonistas (en pM), en donde el agonista es IL-22 humano recombinante (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) o IL-22 murina recombinante (rmIL-22; MAVLQKSMSFSLMGTLAASCLLLIALWAQE ANALPVNTRCKLEVSNFQQPYIVNRTFMLAKEASLADNNTDVRLLIGEKLFRGVSAKD QCYLMKQVLNFTLEDVLLPQSDRFQPYMQEVVPFLTKLSNQLSSCHISGDDQNIQKN VRRLKETVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACV (SEQ ID NO: 30)). Los datos muestran que rhIL-22 y rmIL-22 indujeron la fosforilación de STAT3 de manera dependiente de la concentración, demostrando que la proteína humana de IL-22 se puede unir e inducir la transducción de señales a través de los receptores de IL-22 de ratón tan efectivamente que la IL-22 de ratón.

[00022] La figura 5B demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 también indujeron fosforilación de STAT3 en células Hepal-6 murinas.

[00023] La figura 6A demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 indujeron fosforilación de STAT5 en células murinas FL83 B de una manera dependiente de dosis, demostrando que la proteína humana de IL-22 se puede unir e inducir la transducción de señales a través de los receptores de IL-22 de ratón tan efectivamente que la IL-22 de ratón.

[00024] La figura 6B demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 también indujeron fosforilación de STAT5 en células Hepal-6 murinas.

[00025] La figura 7A muestra una visión general del diseño de un estudio in vivo y la línea de tiempo para comparar la administración peroral (p.o.) del constructo de administración con SEQ ID NO: 15 a niveles de dosis dos veces diarias, 1 mg/kg y 30 mg/kg, y una administración diaria (intraperitoneal (p.i.)) de rhIL-22 a 4 mg/kg. El estudio in vivo se realizó en ratones C57BL/6 hembra normales alimentados con alimento balanceado, de 8 a 10 semanas de edad, ~23 g. La colitis se indujo químicamente con 2.5% de dextrano sulfato de sodio (DSS) en agua potable, ad libitum. Los criterios de evaluación del estudio incluyeron el porcentaje de cambio en peso corporal, índice de actividad de enfermedad, longitud y el peso de colon, e histopatología.

[00026] La figura 7B muestra las características de los grupos experimentales y de control utilizados en el estudio descrito en la figura 7A.

[00027] La figura 8A muestra el porcentaje (%) de cambio en el peso corporal de animales en día 10 de estudio con relación al día 0 de los diversos grupos experimentales y de control. El cambio de peso corporal de línea de base (día 0 vs. 10) por rhIL-22 con SEQ ID NO: 12 o el constructo de suministro con SEQ ID NO: 15 con relación al vehículo no fue significativo como se evaluó por ANOVA unidireccional. El control positivo de modelo (ciclosporina) CsA fue significativamente diferente con relación al Vehículo como se evaluó por un ANOVA unidireccional.

[00028] La figura 8B muestra el cambio en el peso corporal de los animales experimentales y de control durante los primeros 10 días de estudio. El peso corporal medio de grupo CsA durante el período de estudio se mejoró significativamente con relación al control de vehículo del

día 6 al día 10, como se evaluó por ANOVA de dos vías (*, **, ***) rhIL-22 (i.p.), el peso corporal se mejoró significativamente con relación al control de vehículo en el día 10, como se evaluó por ANOVA de dos vías (*), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

[00029] La figura 9 muestra los resultados de los experimentos de ELISA de plasma para determinar los niveles de plasma de IL-22. Los resultados muestran que las concentraciones de rhIL-22 de plasma tendieron a niveles incrementados en plasma después de la alimentación forzada oral de tanto 1 como 30 mg/kg de dosis del constructo de suministro con SEQ ID NO: 15 de una manera dependiente de la dosis (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). ****0.0001; Media + SEM; n = 2 Sin tratamiento, 5 Vehículo, 5 CsA, 5 CsA, 10 otros)

[00030] La figura 10A muestra una vista general de un estudio de dosis única in vivo diseñado para identificar biomarcadores de acoplamiento diana después de la dosis individual (dosificación aguda) de rhIL-22 en ratones CD-1 sanos.

[00031] La figura 10B muestra una vista general de un estudio de múltiples dosis (dosificación subcrónica) in vivo diseñado para identificar biomarcadores de acoplamiento diana después de dosis individuales y múltiples de rhIL-22 en ratones CD-1 sanos.

[00032] La figura 11A muestra que la administración aguda y subcrónica de rhIL-22 incrementa la concentración de IL-22 consistentemente.

[00033] La figura 11B muestra algunos parámetros farmacocinéticos medidos durante los experimentos de dosificación aguda y subcrónica descritos en la figura 11A.

[00034] La figura 12A muestra la concentración de

proteína C reactiva murina circulante inducida (mCRP) en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Los resultados muestran un incremento dependiente del tiempo en mCRP circulante en ambos grupos de estudio.

[00035] La figura 12B muestra un cambio de plegado de la concentración de mCRP de plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[00036] La figura 12C muestra el cambio de plegado de la concentración de mCRP de plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[00037] La figura 13A muestra la concentración de proteína A amiloide sérica murina circulante inducida (mSAA) en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Los resultados muestran un incremento dependiente del tiempo en mSAA circulante en ambos grupos de estudio, con concentraciones de plasma máximas aproximadas aproximadamente 8 horas después de la administración.

[00038] La figura 13B muestra un cambio de plegado de la concentración de mSAA de plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[00039] La figura 13C muestra el cambio de plegado de la concentración de mSAA de plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[00040] La figura 14A muestra la de proteína 3 derivada de islotes de regeneración circulante inducida (Reg3) en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[00041] La figura 14B muestra un cambio de plegado de la

concentración de Reg3 de plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[00042] La figura 14C muestra el cambio de plegado de la concentración de Reg3 de plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[00043] La figura 15 ilustra un diagrama de flujo que muestra cómo la factibilidad de fabricación mejorada puede permitir la traducción clínica.

[00044] La figura 16 ilustra que SEQ ID NO: 15 es una proteína de fusión heteróloga que comprende un dominio de portador (SEQ ID NO: 7) vinculado mediante un espaciador (SEQ ID NO: 13) a interleucina-22 (IL-22, SEQ ID NO: 11). Las proteínas de fusión heterólogas se pueden secuestrar en los cuerpos de inclusión de E. Coli (IB) y por consiguiente requieren replegado y/o purificación.

[00045] La figura 17 ilustra un diagrama de flujo que resume el replegado, purificación, y formulación de las proteínas heterólogas descritas en la presente, tal como, por ejemplo, SEQ ID NO: 14-21, y proteína de fusión que comprende un portador de SEQ ID NO: 1-9, 22, o 23.

[00046] La figura 18 ilustra la optimización iterativa para la eficiencia de replegado mejorada del constructo de SEQ ID NO: 15.

[00047] La figura 19 es una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) que muestra la señal de la proteína replegada optimizada (SEQ ID NO: 15) y los agregados de proteínas que tienen masas moleculares más altas y, por consiguiente, tiempos de retención más bajos.

[00048] La figura 20 ilustra un SDS-PAGE de ejemplo de la transferencia western de la proteína replegada inicial y optimizada (SEQ ID NO: 15).

[00049] Las figuras 21A-21B ilustran una cromatografía de exclusión por tamaño después de una primera purificación

de columna de SEQ ID NO: 15 utilizando la resina de intercambio aniónico NH₂-750F. La figura 21A ilustra una cromatografía de exclusión por tamaño después de una primera purificación de columna de SEQ ID NO: 15 que utiliza la resina de intercambio aniónico NH₂-750F con un volumen de columna de 10 mL y una altura de lecho de 20 cm. La figura 21B ilustra una cromatografía de exclusión por tamaño después de una primera purificación de columna de SEQ ID NO: 15 que utiliza la resina de intercambio aniónico NH₂-750F con volumen de columna de 4.6 L y una altura de lecho de 30 cm.

[00050] Las figuras 22A-22B ilustran una cromatografía de exclusión por tamaño después de una segunda purificación de columna de SEQ ID NO: 15 que utiliza la resina de hidroxiapatita CaPure^{MR}. La figura 22A ilustra una cromatografía de exclusión por tamaño después de una segunda purificación de columna de SEQ ID NO: 15 que utiliza la resina de hidroxiapatita Ca⁺⁺Pure con un volumen de columna de 5 mL, una altura de lecho de 10 cm y una pendiente de 0-25% B, 25C. La figura 22B ilustra una cromatografía de exclusión por tamaño después de una segunda purificación de columna de SEQ ID NO: 15 que utiliza la resina de hidroxiapatita CaPure^{MR} con un volumen de columna de 800 mL, una altura de lecho de 21 cm y una pendiente de 0 -25%, 25CV. Para cada figura un SDS-PAGE correspondiente de muestras de las diferentes fracciones eluidas de la resina CaPure^{MR}.

[00051] Las figuras 23A-23B ilustran una cromatografía de líquido-espectrofotometría de masas (LC-MS) después de la purificación de proteínas de fusión heterólogas. La figura 23A ilustra un cromatógrafo de LC-MS de SEQ ID NO: 17. El pico 1 ilustra SEQ ID NO: 17 correctamente replegada. La figura 23B ilustra un cromatógrafo de LC-MS

de SEQ ID NO: 15. El pico 1 ilustra la SEQ ID NO: 15 corregida replegada. El pico 2 ilustra SEQ ID NO: 15 con la metionina terminal escindida (ilustrada por SEQ ID NO: 20). El pico 3 ilustra la SEQ ID NO: 15 con la metionina terminal escindida (ilustrada por SEQ ID NO: 20) y la acetilación del aminoácido N-terminal resultante.

[00052] La figura 24 ilustra la vista general de estudio del ejemplo 16 para evaluar el transporte del constructo de suministro que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15 a través del epitelio intestinal y hacia la circulación después de la administración oral (abreviada en la presente como P.O.) del constructo.

[00053] Las figuras 25A-25B ilustran gráficas que muestran la concentración de plasma de IL-22 en función del tiempo después de la administración del constructo de suministro de SEQ ID NO: 15. La figura 25A ilustra la concentración de plasma de IL-22 en función del tiempo después de la administración del constructo de suministro de SEQ ID NO: 15. La figura 25B ilustra la concentración de plasma de IL-22BP en función del tiempo después de la administración del constructo de suministro de SEQ ID NO: 15.

[00054] La figura 26A (vehículo) y figura 26B (SEQ ID NO: 15) son gráficas que muestran la concentración de plasma de IL-22 en función del tiempo para ratones individuales.

[00055] Las figuras 27A-27D ilustran que la longitud de espaciador y el acoplamiento de la carga útil al extremo N o C de un portador no afecta significativamente la actividad biológica de la carga útil. La figura 27A ilustra la longitud de varios espaciadores de aminoácidos que no afectaron la inducción de la dimerización de receptor de IL-22. La figura 27B ilustra que el acoplamiento de la

carga útil de IL-22 al extremo N o C de un portador no afectó la inducción de la dimerización de IL-22. La figura 27C ilustra la longitud de varios espaciadores de aminoácidos que no afectaron la inducción de la activación de pSTAT3. La figura 27D ilustra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 al extremo N o C de un portador no afectó la inducción de la activación de pSTAT3.

Descripción Detallada de la Invención

[00056] La presente descripción describe las proteínas de fusión que no se presentan naturalmente (por ejemplo, estructuras de suministro capaces de transportar una o más moléculas heterólogas de carga útil) y los métodos para el replegado y purificación de las proteínas de fusión que no se presentan naturalmente. Por ejemplo, la proteína de fusión que no se presenta naturalmente puede ser un constructo de suministro de IL-22 descrito en la presente.

[00057] Los términos a continuación se analizan para ilustrar los significados de los términos como se utilizan en esta especificación, además de la comprensión de estos términos por aquellos expertos en la técnica. Como se utiliza en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto dicte claramente lo contrario. Se debe observar que las reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración se propone para servir como base de antecedente para el uso de esta terminología exclusiva como "únicamente", "sólo", y similares con relación a la cita de los elementos de reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

[00058] Ciertos intervalos o números se presentan en la presente con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se utiliza

en la presente, debe significar más o menos 1%, 2%, 3%, 4% o 5% del número al que se refiere el término. Como se utiliza en el presente documento, los términos "sujeto" e "individuo" se utilizan indistintamente y pueden ser cualquier animal, incluyendo mamíferos (por ejemplo, un ser humano o un animal no humano).

[00059] Como se utiliza en la presente, los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" y otros equivalentes gramaticales, incluyen el alivio, reducción o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad o condición, mejora, prevención o reducción de la aparición, gravedad o frecuencia de uno o más síntomas adicionales de una enfermedad o condición, mejora o prevención de las causas subyacentes de uno o más síntomas de una enfermedad o condición, inhibición de la enfermedad o condición, tal como, por ejemplo, detención del desarrollo de la enfermedad o condición, alivio de la enfermedad o condición, provocación de la regresión de la enfermedad o condición, alivio de una condición provocada por la enfermedad o condición, o inhibición de los síntomas de la enfermedad o condición ya sea de manera profiláctica y/o terapéuticamente.

[00060] Como se describe en la presente, el término "porcentaje (%) de identidad de secuencia", y los términos con relación al mismo, en el contexto de secuencias de aminoácidos, es el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después alinear las secuencias e introducir separaciones, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con propósitos de determinar el

porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, utilizando software de computadora públicamente disponible tal como el software Clustal Omega, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[00061] Los términos "polipéptido", y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los péptidos también incluyen esencialmente cualquier poliaminoácido incluyendo, pero no limitado a, miméticos de péptido tal como aminoácidos unidos por un éter como se opone a un enlace de amida.

Cargas útiles y constructos de suministro

[00062] Se proporcionan en la presente constructos de suministro capaces de transportar una o más moléculas heterólogas de carga útil (por ejemplo, una o más cargas útiles terapéuticas) a través de células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales intestinales polarizadas) y en la lámina propia mediante transcitosis. Los constructos de suministro pueden comprender un portador acoplado a una carga útil heteróloga. El constructo de suministro puede ser una proteína de fusión que no se presenta naturalmente. El portador puede ser capaz de transportar la carga útil heteróloga a través de células epiteliales polarizadas (por ejemplo, células epiteliales intestinales polarizadas) utilizando rutas de tráfico endógeno. La utilización de una ruta de tráfico endógeno a diferencia del uso de difusión pasiva, puede permitir que el portador

lance la carga útil heteróloga de manera rápida y eficiente a través de células epiteliales sin deteriorar la función de barrera de estas células ni la actividad biológica de la carga útil heteróloga. Además, en el presente documento se proporcionan métodos para la purificación y replegado de los constructos de suministro descritos en la presente.

[00063] Un portador en la presente se puede derivar de un polipéptido secretado por una bacteria. Este portador se puede derivar de un polipéptido secretado de *Vibrio Cholerae* o *Pseudomonas aeruginosa*. El polipéptido secretado por *Vibrio Cholerae* puede ser un polipéptido de Cholix. Un portador derivado de un polipéptido de Cholix puede ser que se presenta naturalmente o que no se presenta naturalmente. Por ejemplo, un polipéptido de Cholix que no se presenta naturalmente puede consistir en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 (un ejemplo de Cholix¹⁻⁶³⁴) (TABLA 1). Un portador derivado de un polipéptido de Cholix puede ser una variante truncada y/o mutada de un polipéptido derivado de Cholix. Por ejemplo, el portador puede comprender o constar de una secuencia de aminoácidos de aquellas con los residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, y 1-386 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 26. En algunos casos, estos portadores tienen una secuencia de aminoácidos de aquellas con los residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, y 1-386 de SEQ ID NO: 4. Las mutaciones pueden incluir una o más sustituciones, supresiones, y/o adiciones. Por ejemplo, un portador en la presente puede comprender una sustitución de V1L. Dicho de manera diferente, en algunas formas de realización, el portador relacionado a colix tiene un aminoácido de leucina en la posición "1". (La posición 1 se refiere al primer aminoácido de las variantes que no tienen una metionina N-terminal o la segunda posición en

las variantes que incluyen una metionina N-terminal. En otras palabras, al determinar la longitud de un portador, se ignora una metionina N-terminal, si está presente). En algunas formas de realización, los portadores que comprenden la experiencia de sustitución de V1L redujeron o eliminaron la escisión del aminoácido N-terminal. En algunas formas de realización, los portadores que comprenden la experiencia de sustitución de V1L redujeron o eliminaron la acetilación del aminoácido N-terminal. Un portador proporcionado en la presente puede tener una activación de ribosilación ADP reducida (por ejemplo, al menos 50% reducida) o extirpada (por ejemplo, ribosilación del factor de alargamiento 2) con respecto a una variante de Cholix que se presenta naturalmente. En algunas formas de realización, el portador puede comprender una metionina N-terminal. En otras formas de realización, ninguna metionina N-terminal está presente.

[00064] Un portador de Cholix truncado puede consistir en, consiste esencialmente en, o comprender los residuos de aminoácidos 1-386 de una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26 (FÓRMULA I). Un portador de Cholix truncado puede consistir en, consiste esencialmente en, o comprender los residuos de aminoácidos 1-266 de una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26 (FÓRMULA I). En algunos casos, un portador de Cholix truncado puede consistir en, consiste esencialmente en, o comprender los residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1. Por consiguiente, en algunos casos, el portador consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 (un ejemplo de Cholix¹⁻³⁸⁶), o SEQ ID NO: 3 (un ejemplo de Cholix¹⁻²⁶⁶). En algunos casos, un portador tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 con una sustitución de V1L. Por consiguiente, en algunos casos, el portador consta de la secuencia de

aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 (un ejemplo de V1L-Cholix¹⁻³⁸⁶), o SEQ ID NO: 5 (un ejemplo de V1L-Cholix¹⁻²⁶⁶). Cualquiera de estos portadores puede incluir uno o más aminoácidos en su extremo N para la expresión en varios microorganismos (por ejemplo, bacterias), por ejemplo, una metionina N-terminal. Este portador puede tener una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6-9.

[00065] El polipéptido de Cholix puede ser una proteína que comprende, consista esencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia, o que tiene 100% de identidad de secuencia, a una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-9 o SEQ ID NOS: 22-23. Un ejemplo de polipéptido de Cholix se presenta en la presente como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 22. También se contemplan en la presente variantes truncadas de polipéptido de Cholix que son capaces de transportar una carga útil a través de células epiteliales polarizadas (por ejemplo, células epiteliales intestinales polarizadas). Estos polipéptidos de Cholix se pueden truncar en cualquiera de las posiciones de aminoácidos de 206 a 633 en comparación a una secuencia de referencia, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 26, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia a la misma.

[00066] También se contemplan en la presente constructos de suministro que comprenden portadores que tienen alta identidad de secuencia a las secuencias anteriores. Esta alta identidad de secuencia puede incluir, al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia. Por consiguiente, en algunos casos, el portador comprende una identidad de secuencia de al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%

o 99% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6-9.

[00067] Un portador contemplado en la presente se puede acoplar a una carga útil, tal como una carga útil heteróloga. Esta carga útil puede ser una carga útil terapéutica. Una carga útil terapéutica puede ser una citoquina, una hormona, un factor de crecimiento, un anticuerpo terapéutico, un antígeno, un fragmento funcional de cualquiera de las anteriores, o cualquier otra proteína que tenga actividad biológica, terapéutica o una proteína que pueda ser deficiente en un sujeto (por ejemplo, una deficiencia genética/hereditaria de una cierta proteína). Las citoquinas contempladas en la presente incluyen quimioquinas monoméricas e interleucinas (también abreviadas en la presente como "IL"). La interleucina puede ser IL-22. La interleucina puede ser de cualquier especie (por ejemplo, de un ser humano o de un roedor). La interleucina puede ser una interleucina humana. La IL-22 humana puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10 (IL-22¹⁻¹⁷⁹) o SEQ ID NO: 11 (IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). Una IL-22 en la presente puede incluir además metionina en su extremo N, por ejemplo, cuando esta proteína de IL-22 se expresa bacteriológicamente. En un caso, una IL-22 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). Una IL-22 en la presente puede incluir además metionina en su extremo N, por ejemplo, cuando esta proteína de IL-22 se expresa bacteriológicamente. En un caso, una IL-22 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). La IL-22 puede comprender, constar esencialmente de, o constar de SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia a la misma o fragmento de la misma. La IL-22

puede comprender, constar esencialmente de, o constar de SEQ ID NO: 11 (IL-22³⁴⁻¹⁷⁹), que es una forma secretada de IL-22, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia a la misma o fragmento de la misma. Una IL-22 puede incluir metionina en su extremo N, por ejemplo, cuando esta proteína de IL-22 se expresa bacteriológicamente. Esta IL-22 puede consistir en, consistir esencialmente en, o comprender una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹).

[00068] En algunos casos, un portador utilizado en cualquiera de los constructos de suministro descritos en la presente puede ser una proteína u otro tipo de molécula capaz de transportar la carga útil terapéutica a través de un epitelio (por ejemplo, un epitelio intestinal polarizado de un sujeto). Este transporte puede incluir la transcitosis. Como se refiere en la presente, "transcitosis" se refiere al tráfico de la molécula de fusión a través de una célula epitelial polarizada. Este tráfico permite la liberación de la carga biológicamente activa desde la membrana basolateral de la célula epitelial polarizada. El proceso de transcitosis puede implicar la interacción del portador con uno o más receptores y/o proteínas en la superficie apical y/o basal, así como dentro de una célula del epitelio (por ejemplo, una célula epitelial intestinal polarizada). El portador puede ser capaz de transportar la carga útil terapéutica a través de un epitelio sin afectar al epitelio, al portador y/o a la función biológica y/o terapéutica de la carga útil.

[00069] Un portador se puede acoplar a una carga útil terapéutica de manera covalente o no covalentemente, y de manera directa o indirectamente. La carga útil terapéutica se puede acoplar directamente al extremo N o extremo C del

portador. En los casos donde el portador se acopla covalentemente a la carga útil, el portador se puede acoplar a la carga útil mediante un espaciador (también conocido en la presente como un ligador). El espaciador puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, o más residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos espaciador pueden ser, por ejemplo, glicina, serina y/o triptófano. Un espaciador puede ser un espaciador escindible o no escindible. Un espaciador escindible puede ser escindible por una enzima o de una manera dependiente de pH.

[00070] Ejemplos de espaciadores contemplados en la presente incluyen secuencias de oligopéptidos tal como S, (GS)_x, (GGS)_x, (GGGS)_x, (SEQ ID NO: 27), (GGGGS)_x (SEQ ID NO: 28), o (GGGGGS)_x (SEQ ID NO: 29), en donde x = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15. En algunos casos, un espaciador consiste en, consiste esencialmente en, o comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13 ((G₄S)₃). (GGGGS₃GGGGS₃GGGGS). En algunos casos, un espaciador consiste en, consiste esencialmente en, o comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 31 ((G₄S)₅). (GGGGS₅GGGGS₅GGGGS₅GGGGS₅GGGGS). En algunos casos, un constructo de suministro comprende una carga útil terapéutica y un portador que no se vinculan covalentemente (por ejemplo, mediante interacciones iónicas, interacciones de van der Waals, interacciones de π - π , etc.). Un portador puede comprender además una o más características, elementos, aminoácidos o modificaciones en su extremo N terminal y/o extremo C. Por ejemplo, algunas formas de realización incluyen una metionina N-terminal en el extremo N del portador. Otras modificaciones (por ejemplo, acetilación) también pueden estar presentes, incluyendo modificaciones para la expresión en un sistema

heterólogo.

[00071] Un constructo de suministro en la presente puede tener una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 o 17 (ejemplos de M+Cholix¹⁻²⁶⁶-(G₄S)₃-IL-22³⁴⁻¹⁷⁹) (TABLA 1). Otros constructos de suministro pueden tener la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 24 o 25 (por ejemplo, cuando se expresan en una célula de mamífero tal como la célula CHO). Estos constructos de suministro de ejemplo transportan la IL-22 a través de células epiteliales intestinales polarizadas intactas y en la lámina propia.

[00072] En varias formas de realización, la proteína de fusión que no se presenta naturalmente tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14-21,24, o 25, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia a la misma. Una vista esquemática del portador, espaciador, y carga útil de una proteína de fusión que no se presenta naturalmente que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15 se ilustra en la figura 16.

[00073] La Tabla 1 muestra secuencias de aminoácidos de moléculas biológicamente activas de ejemplo utilizadas en combinación con los métodos descritos en la presente.

Tabla 1 - Secuencias de aminoácidos de ejemplo

Categoría	SEQ ID NO:	Secuencia de Aminoácidos
Cholix ¹⁻⁶³⁴	SEQ ID NO: 1	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG

		SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALA AHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFV ATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADIL SLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVI TPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQ TIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRAE RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNT PLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIG WDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKP PYKERKDELK
Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 2	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLV PIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTL EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALA AHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFV ATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 3	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLV PIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTL EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG
(V1L) – Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 4	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLV PIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTL

		EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSALA AHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFV ATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
(V1L) – Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 5	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR YVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL PIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSG
M+Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 6	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVL EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSAL AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLF VATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
M+Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 7	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVL EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSG
M+ (V1L) – Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 8	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVL EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR

		HYVNQDAPFGVHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSAL AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF VATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
M+ (V1L) – Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 9	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVULD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSG
IL-22 ¹⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 10	MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSH CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEK LFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPPQSDRFQPYMQE VVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLG ESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 11	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDV RLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPPQSDRF QPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLK TVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
M+IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 12	MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTD VRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPPQSDR FQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLK DTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
(G ₄ S) ₃	SEQ ID NO: 13	GGGGSGGGSGGGGS
M+Cholix ¹⁻	SEQ ID	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVULD

³⁸⁶ – (G ₄ S) ₃ – IL–22 ^{34–179}	NO: 14	EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSAL AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF VATRILFSLDVSFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAGGG GSGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLA KEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFT LEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDD LHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNA CI
M+Cholix ^{1–} ²⁶⁶ – (G ₄ S) ₃ – IL–22 ^{34–179}	SEQ ID NO: 15	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGGGGGSG GGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEA SLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEE VLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
M+ (V1L) – Cholix ^{1–386} – (G ₄ S) ₃ –IL– 22 ^{34–179}	SEQ ID NO: 16	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSAL

		AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF VATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAGGG GSGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLA KEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFT LEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDD LHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNA CI
M+ (V1L) – Cholix ¹⁻²⁶⁶ – (G ₄ S) ₃ –IL– 22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 17	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGGGGGSG GGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEA SLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEE VLFQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
Cholix ¹⁻³⁸⁶ – (G ₄ S) ₃ –IL– 22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 18	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSALA AHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFV ATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAGGGG SGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAK EASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTL EEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDL

		HIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNAC I
(V1L) – Cholix ¹⁻³⁸⁶ – (G ₄ S) ₃ – IL – 22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 19	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTL EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSALA AHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFV ATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAGGGG SGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAK EASLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTL EEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDL HIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNAC I
Cholix ¹⁻²⁶⁶ – (G ₄ S) ₃ – IL – 22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 20	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTL EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGGGGGSGG GGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEAS LADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV LFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNAC I
(V1L) – Cholix ¹⁻²⁶⁶ – (G ₄ S) ₃ – IL – 22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 21	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTL

		EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGGGGGSGG GGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEAS LADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV LFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
(V1L) – Cholix ¹⁻⁶³⁴	SEQ ID NO: 22	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL PIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSALA AHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFV ATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADIL SLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVI TPQGVNTWNTYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQ TIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNT PLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET VIGWMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVALKEQSISTKP PYKERKDELK
M+ (V1L) – Cholix ¹⁻⁶³⁴	SEQ ID NO: 23	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSAL AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF

		VATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADI LSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAV ITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAA QTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYAR IKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAAEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVI GWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTK PPYKERKDELK
Cholix ¹⁻²⁶⁶ - (G ₄ S) ₃ -IL- 22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 24	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL PIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGG GGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEAS LADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV LFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
(V1L)- Cholix ¹⁻²⁶⁶ - (G ₄ S) ₃ -IL- 22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 25	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRH YVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL PIGEDSPASIKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT EQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGG GGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEAS LADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV LFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
M+Cholix ¹⁻	SEQ ID	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVL

$^{266}-(G_4S)_1-$ IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	NO: 32	EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSA PISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQ PYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDT VKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
M+Cholix ¹⁻ $^{266}-(G_4S)_5-$ IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 33	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVL EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSG GGSGGGGGSGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYIT NRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLM KQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLST CHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLL FMSLRNACI
M+IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 34	MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTD VRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDR FQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLK DTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIGGGGSVEEA LNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLY YSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVNQ DAPFGVHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQWK TQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYET

		VAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG
M+Cholix ¹⁻ 386- (G ₄ S) ₁ - IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 35	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWL VPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR HKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSAL AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF VATRILFSHLDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAGGG GSAPISSHCRDLKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNT DVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFQSD RFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKL KDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
	SEQ ID NO: 26	X1-E-X3-X4-L-X6-I-F-D-E-C-R-S-P-C-X16- L-T-P-E-X21-G-K-X24-I-Q-S-K-L-X30-I-P- X33-D-V-V-L-D-E-G-V-L-Y-Y-S-M-T-I-N-D- E-Q-N-D-I-X56-D-E-X59-K-G-E-S-I-I-T- X67-G-E-F-A-T-X73-R-A-T-R-H-Y-V-X81-Q- D-A-P-F-G-V-I-X90-L-D-I-T-T-E-N-G-T-K- X101-Y-S-X104-N-R-K-X108-X109-E-F-X112- I-X114-W-L-V-X118-X119-G-E-D-S-P-A-S-I- K-I-S-X131-D-E-X134-D-Q-X137-R-N-I-I-E- V-P-K-L-Y-S-I-D-L-D-N-Q-T-L-E-Q-W-X160- X161-Q-G-N-V-X166-F-X168-V-T-R-P-E- X174-X175-I-A-I-S-W-P-S-V-S-Y-X186-A-A- X189-K-X191-G-X193-R-H-K-R-W-A-X200-W- X202-T-X204-X205-X206-X207-X208-X209-L- X211-X212-X213-X214-X215-X216-X217- X218-X219-X220-X221-X222-X223-X224-C-T- X227-G-X229-X230-W-X232-G-G-X235-Y-

		X237-T-V-A-G-X242-P-X244-X245-I-X247-V- K-Q-G-X252-E-Q-K-X256-V-E-Q-R-I-H-F-S- X265-X266-N-A-X269-X270-X271-L-A-A-H-R- V-C-G-V-P-L-E-T-L-A-R-X288-R-K-P-R- X293-L-X295-D-D-L-X299-C-X301-Y-X303-A- Q-X306-I-V-S-L-F-X312-A-T-R-X316-L-F- X319-H-X321-D-S-X324-F-T-L-N-L-X330- X331-Q-X333-P-X335-V-X337-E-R-L-X341- X342-X343-R-X345-I-N-E-X349-N-P-G-X353- V-X355-Q-V-L-T-X360-A-R-Q-I-Y-N-D-Y-V- T-X371-H-P-X374-L-X376-P-E-Q-T-S-A- X383-A-Q-A-A-D-I-L-S-L-X393-X394-P-D- X397-D-X399-X400-C-V-A-X404-X405-X406- D-Q-A-N-I-N-X413-E-S-R-S-G-R-S-Y-L- X423-E-N-R-A-V-I-T-X431-Q-G-V-T-N-W-T- Y-Q-E-L-X443-X444-X445-H-Q-X448-L-T- X451-E-X453-Y-V-F-V-G-Y-H-G-T-N-H-X465- A-A-Q-X469-I-V-N-R-I-X475-P-V-P-R-G- X481-X482-T-E-X485-E-X487-X488-W-G-G- X492-Y-V-X495-T-X497-A-X499-X500-X501- X502-X503-Y-X505-R-X507-X508-X509-G-T- X512-X513-X514-X515-X516-X517-T-X519- X520-X521-X522-X523-X524-R-G-V-M-L- X530-V-Y-X533-X534-X535-A-S-L-E-R-F-Y- R-X544-N-X546-X547-L-E-X550-X551-X552- X553-X554-X555-X556-X557-V-I-G-H-X562- L-P-L-R-N-E-A-F-T-G-X573-X574-X575- X576-X577-G-X579-X580-E-T-X583-I-G-W-D- X588-A-I-X591-X592-V-A-I-P-S-T-I-P-G-N- X603-Y-X605-X606-L-X608-X609-X610-E-E- A-X614-A-X616-E-Q-S-I-S-X622-K-P-P-Y-K- E-X629-X630-D-E-L-K; en donde X1 se
--	--	--

		selecciona del grupo que consta de V y L; X3 se selecciona del grupo que consta de E y D; X4 se selecciona del grupo que consta de A y E; X6 se selecciona del grupo que consta de N y K; X16 se selecciona del grupo que consta de S y L; X21 se selecciona del grupo que consta de P y L; X24 se selecciona del grupo que consta de P y Q; X30 se selecciona del grupo que consta de S y F; X33 se selecciona del grupo que consta de S y G; X56 se selecciona del grupo que consta de K y M; X59 se selecciona del grupo que consta de D y G; X67 se selecciona del grupo que consta de I y F; X73 se selecciona del grupo que consta de V e I; X81 se selecciona del grupo que consta de N y S; X90 se selecciona del grupo que consta de H y N; X101 se selecciona del grupo que consta de T y M; X104 se selecciona del grupo que consta de Y y F; X108 se selecciona del grupo que consta de E y D; X109 se selecciona del grupo que consta de G y S; X112 se selecciona del grupo que consta de A y T; X114 se selecciona del grupo que consta de N y H; X118 se selecciona del grupo que consta de P e I; X119 se selecciona del grupo que consta de I y P; X131 se selecciona del grupo que consta de V y I; X134 se selecciona del
--	--	--

		grupo que consta de L y I; X137 se selecciona del grupo que consta de Q y K; X160 se selecciona del grupo que consta de K y E; X161 se selecciona del grupo que consta de T y N; X166 se selecciona del grupo que consta de S y F; X168 se selecciona del grupo que consta de S y A; X174 se selecciona del grupo que consta de H y Q; X175 se selecciona del grupo que consta de N, S, SIAKQS, y SIAKQSIKQS; X186 se selecciona del grupo que consta de K y N; X189 se selecciona del grupo que consta de Q, E, y H; X191 se selecciona del grupo que consta de E, N, y D; X193 se selecciona del grupo que consta de S y A; X200 se selecciona del grupo que consta de H y N; X202 se selecciona del grupo que consta de H, L, F, y R; X204 se selecciona del grupo que consta de G y T; X205 se selecciona del grupo que consta de L y S; X206 se selecciona del grupo que consta de A y P; X207 se selecciona del grupo que consta de L, E, y K; X208 se selecciona del grupo que consta de C y V; X209 se selecciona del grupo que consta de W, V, y T; X211 se selecciona del grupo que consta de V y sin aminoácidos X212 se selecciona del grupo que consta de P y sin aminoácidos X213 se selecciona del grupo que consta de M, I, L, y sin aminoácidos X214 se
--	--	---

		selecciona del grupo que consta de D y sin aminoácidos X215 se selecciona del grupo que consta de A y sin aminoácidos X216 se selecciona del grupo que consta de I y sin aminoácidos X217 se selecciona del grupo que consta de Y y C; X218 se selecciona del grupo que consta de N y F; X219 se selecciona del grupo que consta de Y y F; X220 se selecciona del grupo que consta de I y E; X221 se selecciona del grupo que consta de T y D; X222 se selecciona del grupo que consta de Q y P; X223 se selecciona del grupo que consta de Q, E, y A; X224 se selecciona del grupo que consta de N, L, y Q; X227 se selecciona del grupo que consta de L y Y; X229 se selecciona del grupo que consta de D y E; X230 se selecciona del grupo que consta de N y D; X232 se selecciona del grupo que consta de F, H, y Y; X235 se selecciona del grupo que consta de S y A; X237 se selecciona del grupo que consta de E y K; X242 se selecciona del grupo que consta de T y I; X244 se selecciona del grupo que consta de K, E, y G; X245 se selecciona del grupo que consta de V y A; X247 se selecciona del grupo que consta de T y M; X252 se selecciona del grupo que consta de I y M; X256 se selecciona del grupo que consta de P, T, y A; X265 se selecciona
--	--	--

		del grupo que consta de K, Q, y N; X266 se selecciona del grupo que consta de G y K; X269 se selecciona del grupo que consta de M y I; X270 se selecciona del grupo que consta de S y E; X271 se selecciona del grupo que consta de A y T; X288 se selecciona del grupo que consta de S y G; X293 se selecciona del grupo que consta de D y Y; X295 se selecciona del grupo que consta de T, P, y Q; X299 se selecciona del grupo que consta de S y Q; X301 se selecciona del grupo que consta de A y V; X303 se selecciona del grupo que consta de Q y N; X306 se selecciona del grupo que consta de N y Q; X312 se selecciona del grupo que consta de V y L; X316 se selecciona del grupo que consta de I y M; X319 se selecciona del grupo que consta de S y T; X321 se selecciona del grupo que consta de L y I; X324 se selecciona del grupo que consta de V y I; X330 se selecciona del grupo que consta de D, E, y H; X331 se selecciona del grupo que consta de E y G; X333 se selecciona del grupo que consta de E y A; X335 se selecciona del grupo que consta de E y A; X337 se selecciona del grupo que consta de A y T; X341 se selecciona del grupo que consta de S, D, y T; X342 se selecciona del grupo que consta de D y A; X343 se selecciona del
--	--	--

		grupo que consta de L y I; X345 se selecciona del grupo que consta de R y Q; X349 se selecciona del grupo que consta de N y D; X353 se selecciona del grupo que consta de M y V; X355 se selecciona del grupo que consta de T y I; X360 se selecciona del grupo que consta de V y I; X371 se selecciona del grupo que consta de H y E; X374 se selecciona del grupo que consta de G y L; X376 se selecciona del grupo que consta de T y I; X383 se selecciona del grupo que consta de G y S; X393 se selecciona del grupo que consta de F y L; X394 se selecciona del grupo que consta de C y Y; X397 se selecciona del grupo que consta de A y T; X399 se selecciona del grupo que consta de K, E, y G; X400 se selecciona del grupo que consta de S, P, y H; X404 se selecciona del grupo que consta de S y L; X405 se selecciona del grupo que consta de N y D; X406 se selecciona del grupo que consta de N y S; X413 se selecciona del grupo que consta de I y V; X423 se selecciona del grupo que consta de P y L; X431 se selecciona del grupo que consta de P y Q; X443 se selecciona del grupo que consta de E y D; X444 se selecciona del grupo que consta de A y T; X445 se selecciona del grupo que consta de T y K; X448 se selecciona del
--	--	--

		grupo que consta de A y T; X451 se selecciona del grupo que consta de R y Q; X453 se selecciona del grupo que consta de G y D; X465 se selecciona del grupo que consta de V y A; X469 se selecciona del grupo que consta de T, S, y N; X475 se selecciona del grupo que consta de A, S, y T; X481 se selecciona del grupo que consta de N y S; X482 se selecciona del grupo que consta de N y D; X485 se selecciona del grupo que consta de N, S, y K; X487 se selecciona del grupo que consta de E, R, y K; X488 se selecciona del grupo que consta de K, A, y E; X492 se selecciona del grupo que consta de L y V; X495 se selecciona del grupo que consta de A y S; X497 se selecciona del grupo que consta de H y D; X499 se selecciona del grupo que consta de E y S; X500 se selecciona del grupo que consta de V y L; X501 se selecciona del grupo que consta de A y N; X502 se selecciona del grupo que consta de H y Y; X503 se selecciona del grupo que consta de G y R; X505 se selecciona del grupo que consta de A y T; X507 se selecciona del grupo que consta de I y L; X508 se selecciona del grupo que consta de K y Q; X509 se selecciona del grupo que consta de E y K; X512 se selecciona del grupo que consta de G y A; X513 se selecciona del
--	--	--

		grupo que consta de E, D, y N; X514 se selecciona del grupo que consta de Y, G, A, y N; X515 se selecciona del grupo que consta de G y E; X516 se selecciona del grupo que consta de L y G; X517 se selecciona del grupo que consta de P y L; X519 se selecciona del grupo que consta de R, P, y T; X520 se selecciona del grupo que consta de A y E; X521 se selecciona del grupo que consta de E y K; X522 se selecciona del grupo que consta de R, Q, y K; X523 se selecciona del grupo que consta de D, K, y E; X524 se selecciona del grupo que consta de A, T, y S; X530 se selecciona del grupo que consta de R y K; X533 se selecciona del grupo que consta de I y L; X534 se selecciona del grupo que consta de P y H; X535 se selecciona del grupo que consta de R y Q; X544 se selecciona del grupo que consta de T y I; X546 se selecciona del grupo que consta de T, A, y I; X547 se selecciona del grupo que consta de P y D; X550 se selecciona del grupo que consta de N y K; X551 se selecciona del grupo que consta de A y E; X552 se selecciona del grupo que consta de E, R, y D; X553 se selecciona del grupo que consta de E, N, y R; X554 se selecciona del grupo que consta de H y L; X555 se selecciona del grupo que consta de I y V; X556 se selecciona del
--	--	---

		grupo que consta de T y E; X557 se selecciona del grupo que consta de Q, R, H, y D; X562 se selecciona del grupo que consta de S y P; X573 se selecciona del grupo que consta de P y T; X574 se selecciona del grupo que consta de E y D; X575 se selecciona del grupo que consta de S, A, y R; X576 se selecciona del grupo que consta de A, E, y V; X577 se selecciona del grupo que consta de G, E, y D; X579 se selecciona del grupo que consta de E y S; X580 se selecciona del grupo que consta de D y N; X583 se selecciona del grupo que consta de V y A; X588 se selecciona del grupo que consta de M y I; X591 se selecciona del grupo que consta de H y Y; X592 se selecciona del grupo que consta de A y G; X603 se selecciona del grupo que consta de A y S; X605 se selecciona del grupo que consta de E y A; X606 se selecciona del grupo que consta de E, A, Q, G, V, y R; X608 se selecciona del grupo que consta de A, P, y T; X609 se selecciona del grupo que consta de I, T, y P; X610 se selecciona del grupo que consta de D y A; X614 se selecciona del grupo que consta de V y VVKEAI; X616 se selecciona del grupo que consta de K y E; X622 se selecciona del grupo que consta de T, A, y P; and X629 se selecciona del grupo que consta de R, Q,
--	--	---

		y H; y X630 se selecciona del grupo que consta de K y sin aminoácidos.
--	--	--

[00074] En algunas formas de realización, la proteína de fusión que no se presenta naturalmente comprende o consta de: un portador seleccionado del grupo que consta de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-9, 22-23, y 26 y una carga útil seleccionada del grupo que consta de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 10-12, y en donde el portador y la carga útil se acoplan opcionalmente por un espaciador seleccionado del grupo que consta de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 13 y 27-29.

[00075] Se proporcionan en la presente además composiciones farmacéuticas que comprenden un constructo de suministro y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, el constructo de suministro consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15. En algunos casos, el constructo de suministro consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17. Estas composiciones farmacéuticas se pueden formular para la administración a un sujeto. En algunos casos, se formula una composición farmacéutica para la administración oral a un sujeto.

[00076] Una composición farmacéutica que comprende un constructo de suministro se puede administrar a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) en necesidad de esto para tratar una enfermedad. Las enfermedades que se pueden tratar utilizando los constructos de suministro de esta descripción incluyen enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias. En algunos casos, la enfermedad es una lesión celular epitelial o daño de membranas celulares epiteliales (por ejemplo, en el tracto

gastrointestinal). En algunos casos, la enfermedad es hepatitis, obesidad, enfermedad de hígado graso, inflamación de hígado, o pancreatitis, enfermedad de Crohn (por ejemplo, enfermedad de Crohn fistulizante), colitis ulcerosa (por ejemplo, leve a moderada o moderada a grave), pouchitis, proctitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto versus hospedador, artritis reumatoide, o psoriasis.

Composiciones y métodos de purificación

[00077] La presente descripción contempla métodos para obtener una proteína de fusión purificada que no se presenta naturalmente. La proteína de fusión que no se presenta naturalmente puede comprender IL-22 y un portador, y opcionalmente un espaciador que acopla la IL-22 al portador. La proteína de fusión que no se presenta naturalmente puede ser una proteína que comprende, consista esencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia, o que tiene 100% de identidad de secuencia, a una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14-21, 24, o 25. Las ventajas de los métodos y composiciones descritos en la presente incluyen mantener alta pureza y actividad biológica de las proteínas o polipéptidos purificados.

[00078] Las ventajas específicas de los métodos descritos en la presente incluyen: a) alta actividad biológica de las proteínas de fusión que no se presentan naturalmente debido al plegado correcto utilizando agentes amortiguadores de plegado desarrollados específicamente; b) alta pureza química de las proteínas de fusión purificadas que no se presentan naturalmente con baja toxicidad; c) alto rendimiento de recuperación del material sometido a purificación; d) la reproducibilidad

de los resultados permite una producción y un suministro fiables; e) la fabricabilidad y escalabilidad a una escala de múltiples gramos y múltiples kilogramos para aplicaciones clínicas y comerciales; f) el uso sostenible de los materiales y recursos proporciona un método de purificación rentable y logísticamente efectivo para las moléculas clínicamente pertinentes. Además, los métodos de fabricación mejorados pueden incrementar la velocidad a la cual se pueden desarrollar estas proteínas purificadas para uso terapéutico (figura 22).

[00079] Un proceso de ejemplo para la purificación de las proteínas de fusión que no se presentan naturalmente descritas en la presente se muestra en la figura 17, que ilustra además cantidades de pureza y recuperación de ejemplo para la proteína de fusión que no se presenta naturalmente en cada etapa del proceso de purificación.

[00080] Como se utiliza en la presente, "pureza" indica un nivel de la proteína deseada (por ejemplo, una proteína de fusión que no se presenta naturalmente) o una forma deseada de la proteína (por ejemplo, un monómero de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente, una proteína de fusión corregida plegada que no se presenta naturalmente, o una combinación de las mismas) en una composición que también puede comprender proteínas no deseadas o formas no deseadas de la proteína (por ejemplo, un agregado de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente, una proteína plegada incorrectamente o una combinación de las mismas). El nivel se puede representar por un porcentaje (%) de la proteína o forma deseada de la proteína. Por ejemplo, la pureza puede ser mayor que 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%, o puede ser de 100%. El término "purificado" se puede utilizar para indicar una composición que ha experimentado un incremento de pureza.

Un incremento en la pureza puede ser debido a los procedimientos de purificación descritos en la presente, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de intercambio catiónico, o una combinación de las mismas.

[00081] En algunos casos, los métodos y composiciones de la presente descripción incluyen el uso de al menos dos columnas de cromatografía que se realizan conjuntamente, seguido por un paso de concentración/intercambio de agente amortiguador (ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) para concentrar y amortiguar el intercambio de la solución). Las columnas de cromatografía pueden ser sistemas de cromatografía de baja presión, tal como la columna AKTA Avant 150 o una columna AKTA Pilot de General Electric (GE). En algunos casos, al menos una columna contiene una resina de intercambio aniónico (por ejemplo, resina NH₂-750F) y al menos una columna contiene una resina de hidroxapatita (por ejemplo, resina CaPure^{MR}). En algunos casos, se utiliza al menos una columna que contiene la resina de intercambio aniónico para el paso de captura, en tanto que al menos una columna que contiene la resina de hidroxapatita se utiliza para el paso de pulido. En algunos casos, en su lugar (o además de) la columna de hidroxapatita, se puede utilizar una columna de intercambio catiónico. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la columna de intercambio catiónico con una resina de polimetacrilato con funcionalidad sulfato, tal como el Sulfate-650F TOYOPEARL. La pureza de la proteína solubilizada puede incrementar de 44% a 47% después de UF/DF a 93% a 97% después de la cromatografía de intercambio aniónico y al menos a 99% después de la cromatografía de hidroxapatita. La recuperación de la proteína solubilizada puede incrementar de 70% a 73%

después de la cromatografía de intercambio aniónico y al menos a 97% después de la cromatografía de hidroxapatita.

[00082] Aislamiento de las proteínas de fusión que no se presentan naturalmente de los cuerpos de inclusión

[00083] En algunas formas de realización, las proteínas de fusión que no se presentan naturalmente que se van a purificar se aíslan de los cuerpos de inclusión (IB). Los IB como se describen en la presente pueden ser agregados nucleares o citoplasmáticos de sustancias estables, tal como proteínas y polipéptidos. En algunas formas de realización, los cuerpos de inclusión lavados dobles (DWIB) que comprenden las proteínas de fusión que se presentan no naturalmente (por ejemplo, SEQ ID NO: 14-21) de la fermentación se vuelven a suspender en un sistema de agente amortiguador específico (ver EJEMPLO 6).

[00084] En algunos casos, la concentración de DWIB es de aproximadamente 0.5 g DWIB/100 mL de agente amortiguador a aproximadamente 5 g DWIB/10 mL de agente amortiguador. En algunos casos, la concentración de DWIB es de aproximadamente 2 g DWIB/50 mL de agente amortiguador a aproximadamente 5 g DWIB/50 mL de agente amortiguador. En algunos casos, la concentración de DWIB es de aproximadamente 1 g DWIB/20 mL de agente amortiguador a aproximadamente 1 g DWIB/10 mL de agente amortiguador. En algunos casos, la concentración de DWIB es de al menos 1 g DWIB/100 mL de agente amortiguador. En algunos casos, la concentración de DWIB es de al menos 1 g DWIB/10 mL de agente amortiguador.

[00085] El sistema agente amortiguador para la resuspensión puede comprender una variedad de agentes amortiguadores e ingredientes. En algunos casos, el sistema de agente amortiguador para la resuspensión comprende Guanidina/HCl (Gu-HCl) a una concentración de al

menos 1M, al menos 2M, al menos 4M, al menos 6M, al menos 8M. En algunos casos, la concentración de Gu-HCl es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M. En algunos casos, el sistema de agente amortiguador para resuspensión comprende el agente amortiguador de Tris, en donde la concentración de Tris es de al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 50 mM, o al menos 100 mM. En algunos casos, el agente amortiguador de Tris tiene una concentración de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM. El agente amortiguador de Tris puede ser Tris-HCl. El Tris-HCl puede tener un pH de 8.0 a 8.5. El Tris-HCl puede tener un pH de 8.2. En algunos casos, el sistema de agente amortiguador para la resuspensión comprende ditioneitol (DTT). El DTT puede tener una concentración de al menos 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, o 70 mM. El DDT puede tener una concentración de 7 mM a 11 mM, de 8 mM a 10 mM, o de 9 mM a 10 mM. En algunos casos, el sistema agente amortiguador para la resuspensión comprende el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El EDTA puede tener una concentración de al menos 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, o 2.5 mM. El EDTA puede tener una concentración de 1 mM a 2.5 mM, o de 1.9 mM a 2.1 mM. En algunas formas de realización, el sistema de agente amortiguador para resuspensión comprende, consta esencialmente de, o consta de, un agente amortiguador de Tris, Gu-HCl, y DTT. El sistema de agente amortiguador utilizado para resuspensión puede tener un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 10. En algunos casos, el sistema de agente amortiguador tiene un pH de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8.5. En algunos casos, el pH del sistema de agente amortiguador es de al menos 7. En algunos casos, el pH del sistema de agente amortiguador es de al menos 8. En algunos casos, el pH del

sistema de agente amortiguador es de al menos 8.5.

[00086] *Reducción de las proteínas de fusión solubilizadas que no se presentan naturalmente*

[00087] Se puede adicionar un agente reductor a la solución de resuspensión. El agente reductor puede ser ditiotreitól (DTT). La cantidad de agente reductor utilizado puede depender del volumen de la solución de resuspensión y de la proteína de fusión presente en esa solución. En algunos casos, la cantidad de agente reductor utilizado es de aproximadamente 0.025 mM a aproximadamente 50 mM, de 0.5 mM a 30 mM, de 1 mM a 10 mM. En algunos casos, la cantidad de agente reductor utilizado es de al menos (o entre) 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, o 10 mM.

[00088] La solución de proteína de fusión solubilizada que no se presenta naturalmente (por ejemplo, SEQ ID NO: 14-21) se puede incubar a varias temperaturas que varían de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 40 °C. En algunos casos, la solución de proteína se puede incubar a temperatura ambiente (RT). La incubación se puede realizar en tanto que la solución se está agitando. La solución se puede agitar en una placa de agitación magnética y, entonces se puede centrifugar. La centrifugación se puede realizar en aproximadamente 1,000 xg a aproximadamente 20,000 xg. En algunos casos, la centrifugación se realiza a 15,970 xg durante 90 minutos a 4 °C. El tiempo de incubación puede variar de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 180 minutos, dependiendo de la concentración de ingredientes, la concentración de la proteína de fusión (por ejemplo, SEQ ID NO: 14-21).

[00089] La concentración de proteínas en varias soluciones de principio a fin de los métodos y procedimientos como se describen en la presente se puede

realizar utilizando el ensayo de Bradford. La concentración de la proteína de fusión solubilizada que no se presenta naturalmente puede ser de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL. En algunos casos, la concentración final de la proteína de fusión solubilizada que no se presenta naturalmente puede ser de aproximadamente 3 mg/mL a aproximadamente 30 mg/mL. En algunos casos, la concentración final de la proteína de fusión solubilizada que no se presenta naturalmente puede ser de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. En algunos casos, la concentración final de la proteína de fusión solubilizada que no se presenta naturalmente puede ser de al menos 15 mg/mL.

[00090] Replegado de proteínas de fusión solubilizadas que no se presentan naturalmente

[00091] Las proteínas de fusión que no se presentan naturalmente de la presente descripción pueden ejercer su actividad biológica debido a su estructura tridimensional específica o plegado. Por consiguiente, el replegado de estos polipéptidos puede ser importante en el desarrollo de estos polipéptidos para aplicaciones farmacéuticas. El replegado deseable de una proteína de fusión que comprende al menos un portador y una IL-22 puede comprender el replegado del portador o de la IL-22 en una estructura terciaria similar a una estructura terciaria de un portador que se presenta naturalmente homólogo o de una secuencia de IL-22 o de una estructura terciaria que da por resultado el mantenimiento de la actividad deseada del portador (por ejemplo, la transcitosis de la proteína de fusión) y de la IL-22. Los métodos descritos en la presente pueden comprender el replegado de la proteína de fusión solubilizada que no se presenta naturalmente para producir proteína de fusión replegada que no se presenta

naturalmente. El replegado se puede presentar antes de realizar la cromatografía de intercambio aniónico.

[00092] La solución de proteína solubilizada (por ejemplo, SEQ ID NO: 14-21) se puede adicionar a una solución de replegado, también conocida como una solución de agente amortiguador de replegado. La cantidad de proteína solubilizada utilizada puede ser de 0.1 mg/mL a 1 mg/mL, 1 mg/mL a 100 mg/mL, de 1 mg/mL a 50 mg/mL, de 1 mg/mL a 10 mg/mL, de 5 mg/mL a 20 mg/mL, o aproximadamente 15 mg/mL. La cantidad de proteína solubilizada puede ser de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/mL. La cantidad de proteína solubilizada puede ser no más de 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 mg/mL. La solución de replegado puede tener un pH de entre 7.5 y 8.5, o aproximadamente 7.0

[00093] La solución de agente amortiguador de replegado puede comprender un aminoácido, un poliol, una sal, un azúcar, un reactivo de reducción oxidación, un caótopo, o una combinación de los mismos. El aminoácido puede ser prolina, glicina, arginina o alanina. El poliol puede ser glicerol. La sal puede ser cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) o cloruro de magnesio (MgCl₂). El azúcar puede ser glucosa o sacarosa. El reactivo de reducción oxidación puede ser cisteína, cistamina, glutatión, ditiotreitól (DTT) o sulfato de cobre (CuSO₄). En algunas formas de realización, el agente amortiguador de replegado comprende Tris-base, Arginina-HCl, urea, EDTA, glicerol, L-Cisteína, Cistamina-2HCl, DTT, Gu-HCl, o una combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el agente amortiguador de replegado comprende, consta esencialmente de, o consta de Tris pH 8.5, arginina, glicerol, cisteína, y cistamina. Las concentraciones de agente amortiguador de Tris pueden variar de aproximadamente 20 mM a

aproximadamente 200 mM con un pH que varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 9. Las concentraciones de Arginina-HCl pueden variar de aproximadamente 0.1 M a aproximadamente 1.5 M, de aproximadamente 0.75 M a 1.25 M, o de aproximadamente 1.0 M. Las concentraciones de urea pueden variar de aproximadamente 0.5 M a 1.5 M. Las concentraciones de EDTA pueden variar de aproximadamente 1 M a 3 M. Las concentraciones de glicerol pueden variar de aproximadamente 2 % v/v a aproximadamente 20 % v/v, de aproximadamente 8 % v/v a aproximadamente 12 % v/v, o aproximadamente 10 % v/v. Las concentraciones de cisteína pueden ser de 1 mM a 5 mM, de 2 mM a 4 mM, o aproximadamente 3 mM. La cisteína puede ser L-cisteína. Las concentraciones de cistamina pueden variar de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM, o aproximadamente 3 mM. La cistamina puede ser cistamina-2HCl. Las concentraciones de DTT pueden variar de aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 1 mM. Las concentraciones de Gu-HCl pueden variar de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM. El agente amortiguador de replegado puede comprender, constar esencialmente de, o constar de Tris, L-arginina, urea, EDTA, cisteína y cistamina. El agente amortiguador de replegado puede comprender, constar esencialmente de, o constar de 100 mM de Tris pH 8.5, arginina 1M, 10% (v/v) de glicerol, L-cisteína 3 mM y de Cistamina-2HCl 1 mM. La proteína de fusión que no se presenta naturalmente solubilizada se puede adicionar al agente amortiguador de replegado para producir una mezcla de replegado. La concentración de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente, después de la adición a la mezcla de replegado, puede ser de aproximadamente 0.1 mg/mL a 1.0 mg/mL, 0.5/mL mg a 1.5 mg/mL, de 0.75 mg/mL a 1.25 mg/mL,

o aproximadamente 1 mg/mL. La concentración de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente en la mezcla de replegado puede ser menor que 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.9 mg/mL o 1.0 mg/mL.

[00094] En varias formas de realización, se utiliza un volumen de aproximadamente 100 mL a aproximadamente 10,000 L de agente amortiguador replegado. En algunos casos, el volumen es de aproximadamente 50 L a aproximadamente 1500 L. En algunos casos, el volumen es de aproximadamente 10 L a aproximadamente 300 L. En algunos casos, el volumen es de al menos 200 L.

[00095] La solución de replegado puede tener una cierta temperatura. Por ejemplo, la solución de redoblado se puede pre-enfriar a aproximadamente 2-12 °C. En algunos casos, la solución de replegado se pre-enfría a al menos aproximadamente 3 °C. Este proceso de plegado se puede optimizar dependiendo de la proteína utilizada y de la aplicación (figura 18).

[00096] En algunas formas de realización de la presente descripción, la mezcla de replegado se incuba durante un cierto período de tiempo. En algunos casos, el proceso puede ser de aproximadamente una hora, dos horas, cuatro horas, cinco horas, o 20 horas. En algunos casos, el proceso de replegado toma aproximadamente 15 a aproximadamente 25 horas. En algunos casos, una bomba peristáltica se ajusta a una cierta velocidad de flujo dependiendo de la constitución de la solución (por ejemplo, concentración o volumen) para administrar el material solubilizado en la solución de replegado. En algunos casos, una bomba peristáltica se ajusta a una velocidad de flujo de 60-80 ml/min. El proceso de optimización utilizó un diseño de experimentos (DOE) de 15 matrices diferentes, 12 variables y 200 reacciones de replegado. Las decisiones se

tomaron por un proceso de eliminación.

[00097] En varias formas de realización, se puede realizar un análisis cuantitativo para determinar la cantidad o porcentaje de proteína correctamente plegada en las soluciones que comprenden las proteínas de fusión replegadas que no se presentan naturalmente. En algunos casos, el SEC-HPLC se realiza para determinar la cantidad de la proteína de fusión correctamente plegada que no se presenta naturalmente presente en las muestras de replegado.

[00098] La pureza de la proteína de fusión replegada que no se presenta naturalmente puede ser de 45% a 65%, de 40% a 60%, o de 45% a 55%. La pureza de la proteína de fusión replegada que no se presenta naturalmente puede ser de al menos 40%, 45%, 50% o 55%.

[00099] Filtración de flujo tangencial (TFF) de constructos de suministro de IL-22 solubilizada

[000100] En varias formas de realización, el replegado de proteínas se realiza en combinación con o antes de los sistemas de filtración de flujo tangencial (TFF) (por ejemplo, Millipore) y sistemas de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) con ciertos límites de peso molecular (MWCO).

[000101] La mezcla de replegado de proteínas se puede procesar posteriormente por TFF para concentrar y amortiguar el intercambio de la solución. En algunos casos, el proceso se realiza por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). Durante la ultrafiltración, la solución se puede concentrar de 8 a 12 veces, o aproximadamente 10 veces. La ultrafiltración puede estar seguida por un cambio de agente amortiguador de 5 veces durante la diafiltración con un agente amortiguador de diafiltración. El UF/DF puede comprender el uso de filtros Millipore Ultracell Pellican3

de 10-20 kDa MWCO, con casetes de lámina plana de TFF de 1-2 m². Los parámetros específicos (es decir, TMP) pueden variar dependiendo de las características moleculares de la proteína. El agente amortiguador de diafiltración puede comprender de Tris-base 10-25 mM a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.5, y de NaCl 50-200 mM. Los parámetros específicos pueden variar dependiendo de las características moleculares de la proteína. El volumen final al final del proceso de UF/DF puede ser de aproximadamente 5 L a aproximadamente 100 L. En algunos casos, el volumen final varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 L. En algunos casos el volumen final varía de aproximadamente 80 mL a aproximadamente 10 L.

[000102] La filtración subsiguiente se puede llevar a cabo utilizando un sistema de filtración de flujo. En algunos casos, el sistema de filtración de flujo es un sistema de filtro AkroPac y tubería y bomba peristáltica Cole-Parmer. El ensayo de Bradford se puede realizar para determinar la concentración de proteínas, rendimiento, y recuperación de paso.

[000103] En varias formas de realización, se puede realizar un análisis cuantitativo para determinar la cantidad o porcentaje de proteína correctamente plegada en las soluciones de muestra. En algunos casos, el SEC-HPLC se realiza para determinar la cantidad de la proteína de fusión correctamente plegada que no se presenta naturalmente presente en las UF/DF muestras de replegado y UF/DF.

[000104] La pureza de una solución que comprende la proteína de fusión replegada que no se presenta naturalmente después del UF/DF puede ser de 35% a 55%, de 40% a 50%, de 43% a 47%, o de aproximadamente 45%. La pureza de una solución que comprende la proteína de fusión

replegada que no se presenta naturalmente después del UF/DF puede ser de al menos 35%, 40% o 45%. La recuperación de la proteína de fusión solubilizada, replegada que no se presenta naturalmente después del UF/DF puede ser de 87% a 97%, de 90% a 94%, de 92% a 93%, o de aproximadamente 92.5%. (También se pueden utilizar otros sistemas de concentración e intercambio de agente amortiguador).

[000105] Purificación y recuperación de proteínas de fusión que no se presentan naturalmente

[000106] Como se describe anteriormente, el uso de dos métodos de cromatografía conjuntamente, tal como una cromatografía de intercambio aniónico y una cromatografía de hidroxapatita (o alternativamente una cromatografía de intercambio catiónico), puede dar por resultado la pureza y recuperación incrementadas de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente, tal como los constructos de suministro de IL-22 descritos en la presente, de la solución. En varias formas de realización de la presente descripción, las características específicas de cromatografía (por ejemplo, tipo de columna, resina, velocidad de flujo, sistemas de agente amortiguador, gradiente, y conductividad) se determinan y optimizan dependiendo de varios parámetros, por ejemplo, la proteína que se va a purificar. Se puede utilizar una variedad de columnas de purificación para la purificación de proteínas, como se describe en la presente.

[000107] Cromatografía de intercambio aniónico

[000108] Los métodos descritos en la presente pueden comprender la realización de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) en una mezcla que comprende la proteína de fusión que no se presenta naturalmente. La mezcla puede ser una solución que comprende la proteína de fusión replegada que no se presenta naturalmente. La realización

de una cromatografía de intercambio aniónico puede producir una primera fracción que comprende la proteína de fusión que no se presenta naturalmente.

[000109] Se puede utilizar una variedad de resinas en combinación con los métodos y composiciones de la presente descripción. En algunos casos, la resina contiene cuentas de polimetacrilato con funcionalidad amina. En algunos casos, la resina de intercambio aniónico NH₂-750F se utiliza para purificación de proteínas. Una columna con una altura de lecho de al menos 15 cm, 20 cm, 25 cm o 30 cm se puede rellenar con la resina. Una columna con una altura de lecho de 10 a 50 cm se puede rellenar con resina de una manera que se garantice un volumen de columna que pueda facilitar una capacidad de unión dinámica apropiada (por ejemplo, >20 g/L) para permitir la producción de la cantidad deseada de proteínas. En algunos casos, la capacidad de unión dinámica de la columna es de 5 g/L a 100 g/L, de 20 g/L a aproximadamente 50 g/L, de 15 g/L a 30 g/L, o de 20 g/L a 25 g/L.

[000110] Los sistemas de agente amortiguador utilizados para la elución (por ejemplo, elución de gradiente) en cromatografía de intercambio aniónico pueden comprender una, dos, tres, o cuatro diferentes soluciones de agente amortiguador (por ejemplo, agentes amortiguadores A a D). En algunos casos, se utilizan dos agentes amortiguadores en la cromatografía de intercambio aniónico y se conocen en la presente agentes amortiguadores A y B. En algunos casos, una solución de agente amortiguador comprende Tris (por ejemplo, 10-50 mM, pH 7-9) y/o NaCl (por ejemplo, 0.1-5 M). En algunos casos, la solución de agente amortiguador contiene glicerol. En algunos casos, las soluciones de agente amortiguador utilizadas en la cromatografía de intercambio aniónico, tal como por

ejemplo, el agente amortiguador A o el agente amortiguador B, comprenden, constan esencialmente de, o constan de Tris pH 7.5 y NaCl, y opcionalmente, glicerol.

[000111] El agente amortiguador A puede comprender de 10 mM a 30 mM, de 15 mM a 25 mM, de 19 mM a 21 mM, o aproximadamente 20 mM Tris pH 7.5. El agente amortiguador A puede comprender de 0.25 M a 0.95 M, de 0.35 M a 0.75 M, de 0.45 M a 0.55 M, aproximadamente 0.5 M, de 0.65 M a 0.75 M, o aproximadamente 0.7 M NaCl. El agente amortiguador B puede comprender de 10 mM a 30 mM, de 15 mM a 25 mM, de 19 mM a 21 mM, o aproximadamente 20 mM Tris pH 7.5. El agente amortiguador B puede comprender de 1 M a 3 M, de 1.5 M a 2.5 M, de 1.9 M a 2.1 M, o NaCl de aproximadamente 2 M. El agente amortiguador A puede comprender de 8% a 12%, de 9% a 11%, o aproximadamente 10% (v/v) de glicerol. El agente amortiguador B puede comprender de 8% a 12%, de 9% a 11%, o aproximadamente 10% (v/v) de glicerol.

[000112] Para la cromatografía de intercambio aniónico de SEQ ID NO: 15, el agente amortiguador A puede comprender Tris 20 mM pH 7.5 y NaCl 0.5 M y el agente amortiguador B puede comprender Tris 20 mM pH 7.5 y NaCl 2.0 M (TABLA 4). Para la cromatografía de intercambio aniónico de SEQ ID NO: 17, el agente amortiguador A puede comprender Tris 20 mM pH 7.5 y NaCl 0.5 M y el agente amortiguador B puede comprender Tris 20 mM pH 7.5 y NaCl 2.0 M. Para la cromatografía de intercambio aniónico de SEQ ID NO: 14, el agente amortiguador A puede comprender Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 0.7 M y 10% (v/v) de glicerol, y el agente amortiguador B puede comprender Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 2.0 M y 10% (v/v) de glicerol (Tabla 5).

[000113] En algunas formas de realización, un cierto volumen de una solución salina se adiciona a la solución

de proteína. En algunos casos, se adiciona a la solución de proteína una solución de NaCl con una concentración que varía entre 0.1 y 5 M aproximadamente.

[000114] Las soluciones de proteína se pueden cargar en la columna tal que se pueda observar una velocidad de flujo específica y un tiempo de residencia específico de columna para garantizar la interacción apropiada de la proteína y la fase sólida (por ejemplo, resina). En algunos casos, la velocidad de flujo se controla tal que se determine un tiempo de residencia de columna es de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 6 minutos, o aproximadamente 5 minutos. El tiempo de residencia de columna puede ser de al menos 30 segundos, o 1, 2, 3, 4, o 5 minutos. El tiempo de residencia de columna no puede ser más que 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos. Se puede recolectar y analizar el flujo de paso para determinar si hay proteína no unida, la cual se considera como una pérdida. Para el análisis y purificación de proteínas, se determina la absorbancia a aproximadamente 280 nm para la concentración de proteínas y SEC-HPLC para la pureza de proteínas.

[000115] En algunas formas de realización, un porcentaje (por ejemplo, 0-100%) o velocidad de flujo (por ejemplo, 1-10 mL/min) de un primer agente amortiguador se combina con un segundo agente amortiguador para lograr una velocidad de flujo final específica (por ejemplo, 1-10 mL/min) del sistema de purificación de columna. Por ejemplo, para la purificación de proteínas se realiza un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna (CV) desde 0.0-62.5% de B (100-37.5% de A), seguido de un gradiente de paso a 100% de B (0% de A) para 5 CV adicionales. En algunos casos, se puede realizar un gradiente de 0-75% de B (100-25% de A) 40 CV, Paso 100% de B, 10 CV como un gradiente de elución que indica 91-93% de proteína pura y

una recuperación de >90%.

[000116] La pureza de la proteína de fusión que no se presenta naturalmente en la primera fracción puede ser de 90% a 99% o de 91% a 95%. La pureza de la proteína de fusión solubilizada que no se presenta naturalmente en la primera fracción puede ser de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%. La recuperación de la proteína de fusión solubilizada que no se presenta naturalmente en la primera fracción puede ser de 61% a 81%, de 66% a 76%, o de 71% a 72%.

[000117] Cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de hidroxapatita

[000118] Los métodos descritos en la presente pueden comprender además someter la primera fracción obtenida después de la cromatografía de intercambio aniónico a una resina de intercambio catiónico para obtener una segunda fracción que comprende la proteína de fusión que no se presenta naturalmente. La resina de intercambio catiónico puede ser una resina de metacrilato con funcionalidad sulfato. La resina de intercambio catiónico puede ser una resina de Sulfate-650F TOYOPEARL^{MR}.

[000119] Los métodos descritos en la presente pueden comprender adicionalmente o de manera alternativa la primera fracción obtenida después de la cromatografía de intercambio aniónico a una resina de hidroxapatita para obtener una segunda fracción que comprende la proteína de fusión que no se presenta naturalmente. La resina de hidroxapatita puede ser una resina de intercambio catiónico que comprende además una afinidad al calcio. La resina de hidroxapatita puede comprender fosfato de calcio. La resina de hidroxapatita puede comprender una fórmula química de: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La resina de hidroxapatita puede comprender un tamaño de partícula de

30 µm a 50 µm, de 35 µm a 45 µm, o aproximadamente 39 µm. La resina de hidroxiapatita puede ser la resina CaPure^{MR}.

[000120] Las ventajas de la resina CaPure^{MR} pueden incluir: a) tolerancia a la sal, que permite la adsorción de proteínas a alta conductividad en soluciones acuosas; b) sin preparaciones de proteínas (por ejemplo, proteínas de fusión tal como SEQ ID NO: 14-21) antes de la carga; c) da por resultado una alta recuperación (>90%); d) alta capacidad de unión (>20 mg/mL de resina); e) incrementa la pureza por la remoción de impurezas de bajo peso molecular (LMW); y f) garantiza la depuración de endotoxinas (<1.0 EU/mg).

[000121] La resina de intercambio catiónico o la resina de hidroxiapatita se pueden utilizar para envasar una columna de cromatografía. La columna puede comprender una altura de lecho de 10 cm a 50 cm, o aproximadamente 20 cm. La columna puede comprender una altura de lecho de al menos 10 cm, 15 cm, 20 cm, 25 cm o 30 cm. La columna puede comprender una altura de lecho de no más de 20 cm, 30 cm, 40 cm o 50 cm. En algunos casos, la resina de modo mezclado de hidroxiapatita CaPure^{MR} se utiliza para envasar una columna con una altura de lecho de 10-50 cm, asegurando un volumen de columna que facilita una capacidad de unión dinámica de un máximo de 10-100 g/l para permitir la producción de la cantidad deseada de proteína.

[000122] Los sistemas de agente amortiguador utilizados para la elución (por ejemplo, elución de gradiente) en cromatografía de hidroxiapatita pueden comprender una, dos, tres, o cuatro diferentes soluciones de agente amortiguador (por ejemplo, agentes amortiguadores A a D). En algunos casos, se utilizan dos agentes amortiguadores en la cromatografía de hidroxiapatita y se conocen en la presente agentes amortiguadores A y B. En algunos casos,

una solución de agente amortiguador comprende Tris (por ejemplo, 10-50 mM, pH 7-9) y/o NaCl (por ejemplo, 0.1-5 M). En algunos casos, la solución de agente amortiguador contiene glicerol. En algunos casos, una primera solución de agente amortiguador utilizadas en la cromatografía de hidroxiapatita, tal como por ejemplo, el agente amortiguador A, comprende, consta esencialmente de, o consta de Tris pH 7.5, NaCl, y CaCl_2 . En algunos casos, una segunda solución de agente amortiguador utilizadas en la cromatografía de hidroxiapatita, tal como por ejemplo, el agente amortiguador B, comprende, consta esencialmente de, o consta de fosfato de sodio pH 7.5, NaCl, y CaCl_2 .

[000123] El agente amortiguador A puede comprender de 10 mM a 30 mM, de 15 mM a 25 mM, de 19 mM a 21 mM, o aproximadamente 20 mM Tris pH 7.5. El agente amortiguador A puede comprender de 80 mM a 120 mM, de 90 mM a 110 mM, o aproximadamente 100 mM de NaCl. El agente amortiguador A puede comprender de 0.5 mM a 1.5 mM, de 0.75 mM a 1.25 mM, de 0.9 mM a 1.1 mM, o aproximadamente 1 mM de CaCl_2 . El agente amortiguador B puede comprender de 150 mM a 250 mM, de 175 mM a 225 mM, de 190 mM a 210 mM, o aproximadamente 200 mM de fosfato de sodio pH 7.0. El agente amortiguador B puede comprender de 50 mM a 150 mM, de 75 mM a 125 mM, de 90 mM a 110 mM, o aproximadamente 100 mM de NaCl. El agente amortiguador B puede comprender de 0.5 mM a 1.5 mM, de 0.75 mM a 1.25 mM, de 0.9 mM a 1.1 mM, o aproximadamente 1 mM de CaCl_2 .

[000124] Para la cromatografía de hidroxiapatita de SEQ ID NO: 15, el agente amortiguador A puede comprender Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, y CaCl_2 1 mM, y el agente amortiguador B puede comprender fosfato de sodio 200 mM pH 7.0, NaCl 100 mM, y CaCl_2 1 mM (TABLA 6). Para la cromatografía de hidroxiapatita de SEQ ID NO: 17, el agente

amortiguador A puede comprender Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, y CaCl_2 1 mM, y el agente amortiguador B puede comprender fosfato de sodio 200 mM pH 7.0, NaCl 100 mM, y CaCl_2 1 mM. Para la cromatografía de hidroxapatita de SEQ ID NO: 14, el agente amortiguador A puede comprender Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, y CaCl_2 1 mM, y el agente amortiguador B puede comprender fosfato de sodio 200 mM pH 7.0, NaCl 100 mM, y CaCl_2 1 mM (TABLA 7).

[000125] La pureza de la proteína solubilizada después del uso de resina de intercambio catiónico o resina de hidroxapatita puede ser de 99% a 100%. La pureza de la proteína de fusión solubilizada después del uso de la resina de hidroxapatita puede ser de al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. La recuperación de la proteína de fusión solubilizada después del uso de la resina de hidroxapatita puede ser de 85% a 100%, de 96% a 99%, o de 97% a 98%. La de resina de hidroxapatita puede ser CaPure^{MR}.

[000126] Las fracciones recolectadas durante la cromatografía en columna que contienen el compuesto purificado (por ejemplo, proteína de fusión) se pueden concentrar y formular para la administración utilizando intercambio de agente amortiguador o diafiltración. Por ejemplo, las fracciones recolectadas durante CaPure^{MR} se pueden concentrar y formular utilizando un sistema de TFF (por ejemplo, Pall corporation) para concentrar la proteína. La proteína se puede concentrar a una concentración final de 20 mg/mL seguido por un intercambio de agente amortiguador de 5 veces. El proceso de filtración se puede realizar utilizando ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) y filtros con casetes de lámina plana de TFF de MWCO Millipore Pellican3 de 10 kDa de 0.114 m². El MWCO del sistema de filtración puede variar dependiendo de la

proteína (por ejemplo, peso molecular) que se va a purificar. El agente amortiguador de diafiltración puede constar de fosfato de sodio 10-20 mM a aproximadamente pH 7.0, NaCl 50-100 mM. La SEQ ID NO: 14-21 formulada se puede filtrar posteriormente utilizando un sistema de filtración de flujo que emplea un filtro AkroPac de 0.8/0.2 µm y una bomba peristáltica Cole-Parmer y tubería. La proteína purificada y formulada se puede almacenar en alícuotas a -80 °C hasta el uso posterior.

[000127] En formas de realización específicas, las proteínas analizadas por SEC-HPLC pueden mostrar pureza por encima de 97% (habitualmente >98%) utilizando la columna de TSKgel GW3000SWXL, 5µm, 7.8 mm de Diámetro interno x 30.0 cm de L (Tosoh Bioscience, 8541).

Análisis de proteínas

[000128] Las muestras de diferentes fracciones se pueden analizar por SDS-PAGE utilizando el sistema de formación de imágenes Bio-Rad ChemiDoc^{MR} MP, y las fracciones recolectadas durante la cromatografía en columna se pueden analizar para determinar el contenido de proteínas utilizando Nanodrop One^{MR} de Thermo Fisher. Las técnicas generales para la detección o análisis de proteínas incluyen electroforesis en gel, microscopía de fluorescencia, electroforesis capilar, espectrometría de masas, ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética, o resonancia magnética nuclear.

Métodos de Tratamiento

[000129] En varias formas de realización de la presente descripción, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de fusión de la descripción se proporcionan para uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias. Estas composiciones farmacéuticas se pueden formular para administración oral.

Las "enfermedades inflamatorias" pueden incluir todas las enfermedades asociadas con la inflamación aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del cuerpo a estímulos dañinos y resulta de un movimiento incrementado de plasma y leucocitos (tal como, por ejemplo, granulocitos) desde la sangre hacia los tejidos lesionados. Varios eventos bioquímicos propagan y maduran la respuesta inflamatoria, lo que implica el sistema vascular local, el sistema inmunitario, y varias células dentro del tejido lesionado. La inflamación prolongada se conoce como inflamación crónica, que conduce a un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el sitio de inflamación y se caracteriza por la destrucción y curación simultánea del tejido del proceso inflamatorio. Las enfermedades inflamatorias se pueden provocar, por ejemplo, por quemaduras, irritantes químicos, quemadura por congelación, toxinas, infecciones por patógenos, lesión física, reacciones inmunitarias debido a hipersensibilidad, radiación ionizante, o cuerpos extraños, tal como, por ejemplo, fragmentos, suciedad y residuos. En algunas formas de realización, la enfermedad inflamatoria es lesión de células epiteliales, hepatitis, obesidad, enfermedad de hígado graso, inflamación de hígado, pancreatitis, enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn fistulizante, colitis ulcerosa, colitis ulcerosa leve a moderada o moderada a grave, pouchitis, proctitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto versus hospedador, artritis reumatoide, o psoriasis.

[000130] Se describe además en la presente métodos para tratar una enfermedad o condición en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión que no se presenta naturalmente de fusión. En algunas formas

de realización, la enfermedad o condición es lesión de células epiteliales, hepatitis, obesidad, enfermedad de hígado graso, inflamación de hígado, pancreatitis, enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn fistulizante, colitis ulcerosa, colitis ulcerosa leve a moderada o moderada a grave, pouchitis, proctitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto versus hospedador, artritis reumatoide, o psoriasis. La proteína de fusión que no se presenta naturalmente se puede administrar por vía oral al sujeto. El sujeto puede ser humano.

EJEMPLOS

[000131] Estos ejemplos se proporcionan con propósitos ilustrativos solamente y no para limitar el alcance de las reivindicaciones proporcionadas en la presente.

EJEMPLO 1

Expresión de un Constructo de suministro

[000132] En este ejemplo, se describe en general la preparación de un constructo de suministro como una secuencia de aminoácidos individual que comprende una secuencia portadora derivada de Cholix, una secuencia espaciadora, y una carga útil terapéutica.

[000133] Primero, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un constructo de suministro de SEQ ID NO: 15 se amplificó por PCR, que incorpora pares de enzimas de restricción de sitios de NdeI y EcoRI, PstI y PstI, AgeI y EcoRI, o PstI y EcoRI en dos extremos de los productos de PCR. Después de la digestión enzimática de restricción, los productos de PCT se clonaron en un plásmido apropiado para la expresión celular, que se digirió con los pares de enzimas de restricción correspondientes. El plásmido codificó para un constructo de suministro que comprendió la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15.

[000134] El constructo de suministro se expresó como sigue: Los constructos de suministro se expresaron como sigue: células competentes BL21(DE3) pLysS de E. Coli (Novagen, Madison, Wis.) se transformaron usando un método de choque térmico estándar en presencia del plásmido apropiado para generar las células de expresión del constructo de suministro, seleccionadas en el medio que contiene ampicilina, y se desarrollaron en caldo Luria-Bertani (Difco; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) con antibiótico, después se indujeron para la expresión de proteínas por la adición de isopropil-D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG) a OD 0.6. Dos horas después de la inducción de IPTG, las células se recolectaron por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 minutos. Los cuerpos de inclusión se aislaron después de la lisis celular y se lavaron dos veces con agua en una relación de 1g/10 mL. El gránulo de la lisis celular se volvió a suspender con agua seguido por centrifugación de una hora a 10,000 rpm a 4°C. Este lavado entonces se repitió una vez. Los IB (DWIB) lavados dobles en la misma se solubilizaron en un agente amortiguador que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8.2), guanidina 6 M HCl, y ditiotreitól 10 mM (DTT). El material solubilizado entonces se diluyó en un agente amortiguador de plegado que contenía Tris 0.1 M (pH=8.5 a 4°C), L-arginina 1.0 M, 10% de glicerol, L-cisteína 3 mM, cistamina-2HCl 1 mM. La proteína replegada con SEQ ID NO: 15 se purificó por cromatografía de intercambio aniónico (Intercambio iónico de sefarosa Q) y cromatografía de Filtración en Gel Superdex 200 (Amersham Biosciences, Inc., Sweden). La pureza de la proteína se evaluó por SDS-PAGE y HPLC analítica (Agilent, Inc. Palo Alto, Calif.).

[000135] El constructo de suministro se evaluó para

verificar el plegamiento apropiado con respecto a su tamaño molecular anticipado. Después de la inducción, la proteína expresada se recolectó de cuerpos de inclusión. Utilizando los cuerpos de inclusión, el grado de expresión del constructo de suministro se verificó por electroforesis en gel, y el peso molecular evidente se comparó con la masa calculada.

[000136] Los resultados mostraron producción estable y eficiente de un constructo de suministro funcional en alto rendimiento y pureza.

EJEMPLO 2

Modelo *In Vitro* de Evaluación de Transporte de Carga Útil a través de Células Epiteliales

[000137] Este ejemplo muestra un modelo *in vitro* diseñado para evaluar las propiedades de transporte de cargas útiles o de constructos de suministro descritos en la presente.

[000138] La figura 1 muestra esquemáticamente una configuración que comprende una cámara apical arriba de una monocapa de células epiteliales y una cámara basal debajo de esta monocapa de células epiteliales.

[000139] Para la permeabilidad apical a basolateral, se agregaron artículos de prueba (por ejemplo, constructo de suministro, carga útil, etc.) al lado apical (A) y la cantidad de permeación se determinó en el lado basolateral (B). Para la permeabilidad del basolateral a apical, se agregaron artículos de prueba al lado basolateral (B) y la cantidad de permeación se determinó en el lado apical (A).

[000140] Los datos se pueden expresar como permeabilidad (Papp) de acuerdo con la siguiente ecuación: $Papp = (dQ/dt) / (C_0 \cdot A)$. Q/dt es una velocidad de permeación, C_0 es la concentración inicial del artículo de prueba, y A es el área de la monocapa. Una relación de transporte de eflujo (Re) se puede calcular de acuerdo con la siguiente

ecuación: $(Re) = Papp(B-A)/Papp(A-B)$. $Re > 2$ puede indicar un sustrato potencial para P-gp u otros transportadores de flujo activos.

[000141] Las células SMI-100 o Caco-2 se pueden usar para evaluar la función de transcitosis de un portador o constructo de suministro *in vitro*.

[000142] Para células Caco-2, se llevó a cabo un ensayo ELISA para evaluar la capacidad de un portador o constructo de suministro para moverse a través de las monocapas de células Caco-2 a través de la transcitosis. Las células Caco-2 (ATCC **HTB-37^{MR}**) se mantuvieron en CO₂ al 5% a 37°C en medio completo: medio de Eagle modificado de Dulbecco F12 (DMEM F12) complementado con 10% de suero bovino fetal, glutamina 2.5 mM, 100 U de penicilina/ml, y 100 g de estreptomicina/ml (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.). Las células se alimentaron cada 2 a 3 días con este medio (medio completo designado) y se hicieron pasar cada 5 a 7 días. Para los ensayos, las células se sembraron en placas de 24 o 96 concavidades y se desarrollaron a confluencia.

[000143] Se desarrollaron células Caco-2 como monocapas confluentes en soportes transwell de membrana de policarbonato de tamaño de poro de 0.4- μ m recubiertas con colágeno (Corning-Costar, Cambridge, MA) y se usaron 18-25 días después de lograr una resistencia eléctrica transepitelial (TER) de $>250 \cdot \text{cm}^2$ como es medido usando un voltímetro Millicell-ERSMR (Millipore). El transporte apical a basolateral (AB) de un portador o constructo de suministro a través de estas monocapas se determinó al medir la cantidad de proteína transportada en ciertos puntos de tiempo (por ejemplo, 15, 30, y 45 minutos) después de aplicación apical de 4.7 nM, 23.6 nM y 236 nM del constructo de suministro a 37°C. Las mediciones TER y el grado de dextrano fluorescente 10 kDa (medido usando un

protocolo de exclusión de tamaño a HPLC) se usaron para verificar las propiedades de la barrera de monocapa durante el curso del estudio. La extensión del transporte del constructo de suministro (por ejemplo, SEQ ID NO: 15) se determinó por titulación del medio recolectado en el ensayo de citotoxicidad basado en células. El constructo de suministro transportado se midió por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo anti-portador o anti-carga útil, tal como anti-IL-22) para la captura y supresión.

[000144] Monocapas confluentes de los tejidos del intestino delgado humanos (SMI-100, MatTek Corporation; Ashland, MA, USA) establecidos en los insertos de cultivo celular se dejaron estabilizar durante 24 horas a 37°C antes del uso. Solo los insertos que tienen una resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de $> 400 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ se consideraron que tienen integridad de monocapa suficiente para uso en los estudios. Una verificación secundaria de la integridad de la monocapa se llevó a cabo al evaluar la supresión del transporte de dextrano a 70 kD. Las cámaras se lavaron una vez con el amortiguador de transporte (PBS). Las moléculas de prueba, preparadas a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, se aplicaron a la superficie apical de insertos en volúmenes de 100 μL . Los volúmenes basolaterales de 500 μL PBS se reemplazaron en cada punto de tiempo para estudios de transporte. Cada condición experimental se llevó a cabo en triplicado.

EJEMPLO 3

Transporte Mediado por Portador de IL-22 a Través de Células Epiteliales Intestinales Polarizadas

[000145] Este ejemplo muestra que un portador (SEQ ID NO: 7) puede transportar una carga útil de IL-22 (SEQ ID NO:

11) a través de las células epiteliales intestinales polarizadas *in vitro*. Este ejemplo muestra además que el portador con SEQ ID NO: 7 puede transportar una carga útil de IL-22 biológicamente activa a través de las células epiteliales intestinales polarizadas y a la lamina propia *in vivo*.

[000146] El transporte del constructo de suministro (SEQ ID NO: 15) a través de las monocapas de células Caco-2 y el tejido epitelial del intestino delgado (también referido en la presente como SMI-100) se probó al aplicar el constructo de suministro a la membrana apical de las células epiteliales, de acuerdo con el Ejemplo 2 y como se ilustra en la Figura 1 para el transporte apical (A) a basal (B). Los experimentos se ejecutaron en duplicado y las muestras de la cámara basolateral se recolectaron a 15, 30, y 45 minutos después de la aplicación apical para determinar la cantidad de proteína transportada. La cantidad de proteína transportada se midió usando los ensayos ELISA como se describen en el Ejemplo 2.

[000147] Los datos en la figura 2 y la figura 3 muestra que un portador (SEQ ID NO: 7) cuando se acopla a IL-22 (SEQ ID NO: 11) dio por resultado el transporte de la carga útil de IL-22 a través de tanto monocapas de Caco-2 (figura 2) como SMI-100 PF (figura 3) en una manera dependiente de tiempo, y que el constructo de suministro dio por resultado aproximadamente 2-3 veces más IL-22 que cruzar las células epiteliales como se compara a una IL-22 (SEQ ID NO: 12, M+ IL-22³⁴⁻¹⁷⁹) sola que no se acopló a un portador.

[000148] Para los experimentos *in vivo*, se probó la transcitosis usando ratas Wistar machos. Las ratas Wistar machos se alojaron 3-5 por jaula con un ciclo 12/12 h de luz/oscuridad y fueron de aproximadamente 225-275 g (aproximadamente de 6-8 semanas de edad) cuando se

colocaron en el estudio. Los experimentos se condujeron durante la fase de luz usando un protocolo no de recuperación que usa anestesia de isofluorano continua. Se condujo a una incisión abdominal de línea media de 4-5 cm que expuso las regiones del yeyuno medio. Las soluciones madre a 3.86×10^{-5} M del constructo de suministro (SEQ ID NO: 15) se prepararon en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), con 50 L (por 250 g de rata) que se administraron por inyección intraluminal (ILI) usando una aguja de calibre 29. El mesenterio del sitio de inyección entonces se marcó con un marcador permanente. En la terminación del estudio, una región de 3-5 mm que capturó el segmento del intestino marcado se aisló y se procesó para evaluación microscópica.

[000149] Los resultados de la actividad de transcitosis del constructo de suministro (SEQ ID NO: 15) se muestran en la figura 4, mostrando que las cantidades significativas de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) cruzó un epitelio intestinal intacto y polarizado *in vivo* cuando se proporcionó como parte de un constructo de suministro que incluye un portador derivado de Cholix (SEQ ID NO: 7) acoplado a IL-22. Esta imagen de microscopio muestra el transporte de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) del sitio apical del epitelio intestinal (resaltado por flechas blancas #1) al sitio basal de las células epiteliales (resaltado por la flecha blanca #2) y dentro en la *lamina propria* (abreviado como "l.p.") después de la aplicación luminal del constructo de suministro de SEQ ID NO: 15 al yeyuno de ratas Wistar. La imagen muestra además que la IL-22 interactuó y se unió a un grado significativo a los receptores de IL-22 situados en las células dentro de la *lamina propria* y en la membrana basal exterior del epitelio polarizado (resaltado por flechas blancas #3). La

localización de IL-22 se indica por las flechas blancas #2 y #3.

EJEMPLO 4

La IL-22 humana recombinante se une a los receptores de IL-22 murina

[000150] Este ejemplo demuestra que la IL-22 humana recombinante (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) se une a los receptores de IL-22 murina de una manera dependiente de dosis comparable a la IL-22 murina recombinante (rmIL-22).

[000151] La figura 5A demuestra la fosforilación de STAT3 en células murinas FL83 B en función de la concentración de agonistas (en pM), en donde el agonista es rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) o rmIL-22. Los datos muestran que rhIL-22 y rmIL-22 indujeron la fosforilación de STAT3 de manera dependiente de la concentración, demostrando que la proteína humana de IL-22 se puede unir e inducir la transducción de señales a través de los receptores de IL-22 de ratón tan efectivamente que la IL-22 de ratón.

[000152] La figura 5B demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 también indujeron fosforilación de STAT3 en células Hepal-6 murinas.

[000153] La figura 6A demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 indujeron fosforilación de STAT5 en células murinas FL83 B de una manera dependiente de dosis, demostrando que la proteína humana de IL-22 se puede unir e inducir la transducción de señales a través de los receptores de IL-22 de ratón con eficacia comparable a la IL-22 de ratón.

[000154] La figura 6B demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 también indujeron fosforilación de STAT5 en células Hepal-6 murina, pero se necesitará realizar una variación de dosis adicional en los experimentos de seguimiento.

[000155] Estos datos proporcionan fuerte evidencia de que rhIL-22 (por ejemplo, como se utiliza en los constructos de suministro con SEQ ID NO: 10 u 11) es capaz de activar STAT3 y STAT5 en células murinas, proporcionando de esta manera la justificación para utilizar estos constructos de suministro en modelos murinos para evaluar la actividad y función de IL-22.

EJEMPLO 5

Eficacia in vivo del constructo de Suministro con SEQ ID NO: 15 en el modelo Colitis

[000156] Este ejemplo demuestra la eficacia in vivo del constructo de suministro con SEQ ID NO: 15 que comprende un portador derivado de Cholix de SEQ ID NO: 7 acoplado a una IL-22 con SEQ ID NO: 11 mediante un ligador con SEQ ID NO: 13 en comparación a IL-22 sola (SEQ ID NO: 12) en modelo de ratón de sulfato de dextrano sódico (DSS).

[000157] La figura 7A muestra una visión general del diseño de un estudio in vivo y la línea de tiempo para comparar la administración peroral (p.o.) del constructo de suministro de SEQ ID NO: 15 a niveles de dosis dos veces diarias, 1 mg/kg y 30 mg/kg, y una administración diaria (intraperitoneal (p.i.)) de rhIL-22 a 4 mg/kg. El estudio in vivo se realizó en ratones C57BL/6 hembra normales alimentados con alimento balanceado, de 8 a 10 semanas de edad, ~23 g. La colitis se indujo químicamente con 2.5% de dextrano sulfato de sodio (DSS) en agua potable, ad libitum. Los criterios de evaluación del estudio incluyeron el porcentaje de cambio en peso corporal, índice de actividad de enfermedad, longitud y el peso de colon, e histopatología.

[000158] La figura 7B muestra las características de los grupos experimentales y de control utilizados en el estudio descrito en la figura 7A.

[000159] La figura 8A muestra el porcentaje (%) de cambio en el peso corporal de animales en día 10 de estudio con relación al día 0 de los diversos grupos experimentales y de control. El cambio de peso corporal de línea de base (día 0 vs. 10) por rhIL-22 con SEQ ID NO: 12 o el constructo de suministro con SEQ ID NO: 15 con relación al vehículo no fue significativo como se evaluó por ANOVA unidireccional. El control positivo de modelo (ciclosporina) CsA fue significativamente diferente con relación al Vehículo como se evaluó por un ANOVA unidireccional.

[000160] La figura 8B muestra el cambio en el peso corporal de los animales experimentales y de control durante los primeros 10 días de estudio. El peso corporal medio de grupo CsA durante el período de estudio se mejoró significativamente con relación al control de vehículo del día 6 al día 10, como se evaluó por ANOVA de dos vías (*, **, ***) rhIL-22 (i.p.), el peso corporal se mejoró significativamente con relación al control de vehículo en el día 10, como se evaluó por ANOVA de dos vías (*, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

[000161] La figura 9 muestra los resultados de los experimentos de ELISA de plasma para determinar los niveles de plasma de IL-22. Los resultados muestran que las concentraciones de rhIL-22 de plasma tendieron a niveles incrementados en plasma después de la alimentación forzada oral de tanto 1 como 30 mg/kg de dosis del constructo de suministro con SEQ ID NO: 15 de una manera dependiente de la dosis (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). ****0.0001; Media + SEM; n = 2 Sin tratamiento, 5 Vehículo, 5 CsA, 5 CsA, 10 otros)

[000162] Estos datos muestran que el constructo de suministro con SEQ ID NO: 15 indujo una tendencia

dependiente de la dosis hacia la mejora de peso corporal después de la alimentación forzada por vía oral. La IL-22 se midió en niveles incrementados en plasma después de la alimentación forzada oral de dosis de tanto 1 como 30 mg/kg del constructo de suministro con SEQ ID NO: 15 en una forma dependiente de la dosis. Estos datos sugieren que el constructo de suministro oralmente administrado con SEQ ID NO: 15 es capaz de reducir los síntomas de colitis en un modelo de ratón de DSS comparable a rhIL-22 administrado vía i.p.

[000163] Además, los biomarcadores para el constructo de suministro oralmente administrable con SEQ ID NO: 15 se evaluaron al administrar rhIL-22 a ratones de CD-1 como se describe a continuación.

[000164] La figura 10A muestra una vista general de un estudio de dosis única in vivo diseñado para identificar biomarcadores de acoplamiento diana después de la dosis individual (dosificación aguda) de rhIL-22 en ratones CD-1 sanos.

[000165] La figura 10B muestra una vista general de un estudio de múltiples dosis (dosificación subcrónica) in vivo diseñado para identificar biomarcadores de acoplamiento diana después de dosis individuales y múltiples de rhIL-22 en ratones CD-1 sanos.

[000166] La figura 11A muestra que la administración aguda y subcrónica de rhIL-22 incrementa la concentración de IL-22 consistentemente.

[000167] La figura 11B muestra algunos parámetros farmacocinéticos medidos durante los experimentos de dosificación aguda y subcrónica descritos en la figura 11A.

[000168] La figura 12A muestra la concentración de proteína C reactiva murina circulante inducida (mCRP) en

respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Los resultados muestran un incremento dependiente del tiempo en mCRP circulante en ambos grupos de estudio.

[000169] La figura 12B muestra un cambio de plegado de la concentración de mCRP de plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[000170] La figura 12C muestra el cambio de plegado de la concentración de mCRP de plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[000171] La figura 13A muestra la concentración de proteína A amiloide sérica murina circulante inducida (mSAA) en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Los resultados muestran un incremento dependiente del tiempo en mSAA circulante en ambos grupos de estudio, con concentraciones de plasma máximas aproximadas aproximadamente 8 horas después de la administración.

[000172] La figura 13B muestra un cambio de plegado de la concentración de mSAA de plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[000173] La figura 13C muestra el cambio de plegado de la concentración de mSAA de plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[000174] La figura 14A muestra la de proteína 3 derivada de islotes de regeneración circulante inducida (Reg3) en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[000175] La figura 14B muestra un cambio de plegado de la concentración de Reg3 de plasma 1 día después de la

dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[000176] La figura 14C muestra el cambio de plegado de la concentración de Reg3 de plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

[000177] Estos resultados demuestran que tres biomarcadores de IL-22 PD potenciales de acoplamiento diana: La proteína C reactiva (CRP), proteína A amiloide sérica (SAA), y proteína 3 derivada de islotes de regeneración regeneradora (Reg3) que se puede utilizar en estudios que evalúan la farmacodinámica (PD) de constructos de suministro tal como aquellas con SEQ ID NO: 15 o 17.

EJEMPLO 6

Solubilización de proteínas

[000178] 627 g de cuerpos de inclusión lavados doble (DWIB) de fermentación de SEQ ID NO: 15 se resuspendieron en 4500 mL de Guanidina 8M/HCl (Gu-HCl), y Tris 50mM pH a 8.0. Posteriormente, se adicionó Tris 50 mM pH 8.5 para completar el volumen a 6.0 L. La solución se agitó suavemente sobre una placa de agitación y se adicionaron 9.225 g del agente reductor ditiotreitól (DTT). La solución de proteína solubilizada final (SEQ ID NO: 15) de 6L constó de Gu-HCl6M, Tris 50 mM a pH 8.0, DTT 10mM, y ~1g DWIB/10 mL de agente amortiguador. La proteína solubilizada (SEQ ID NO: 15) se incubó a temperatura ambiente (RT) en tanto que se agitaba en una placa de agitación magnética, y entonces se centrifugó a 15.970 xg durante 90 minutos a 4 °C. El sobrenadante que comprende la proteína solubilizada se transfirió cuidadosamente a un nuevo recipiente con un volumen total de 5520 mL. La determinación de concentración de proteínas se realizó por el ensayo de Bradford y se determinó en 15 mg/mL.

[000179] Los datos demuestran que la solubilización de

proteínas se puede realizar utilizando el procedimiento anterior.

EJEMPLO 7

Replegado de proteínas

[000180] Este ejemplo demuestra el replegado de proteínas como parte del proceso de purificación, como se describe en el diagrama de flujo de la figura 17.

[000181] Se investigó, desarrolló y optimizó cuidadosamente una solución de replegado (figura 18). El proceso de optimización utilizó un diseño de experimentos (DOE) de 15 matrices diferentes, 12 variables y 200 reacciones de replegado. Las decisiones se tomaron por un proceso de eliminación. La mezcla de replegado inicial (que contiene la solución de replegado inicial y la proteína solubilizada replegada (SEQ ID NO: 15)) se presenta en la Tabla 2. Una mezcla de replegado optimizada (que contiene la solución de replegado optimizada y la proteína solubilizada replegada (SEQ ID NO: 15)) se presenta en la Tabla 3.

Tabla 2 - mezcla de replegado inicial

Tris 100 mM pH 8.5 (a 4°C)
Arginina 0.5 M
Urea 1 M
EDTA 2 mM
GSH 0.3 mM
GSSG 1 mM
Concentración de replegado de 0.2 mg/mL

Tabla 3 - mezcla de replegado optimizada

Tris 100 mM pH 8.5 (a 4°C)
Arginina 1.0 M

10% de glicerol
L-cisteína 3 mM
cistamina-2HCl 1mM
Concentración de replegado de >0.1 mg/mL

[000182] La solución de replegado de 105L se incubó a 4 °C durante 16 horas y entonces se filtró a través de un filtro de flujo (AkroPac por Pall corporation o Sartopore 2XLG por Sartorius) utilizando una membrana de 0.8/0.2 μ m y una bomba peristáltica Cole-Parmer y tubería.

[000183] La proteína solubilizada (SEQ ID NO: 15) (105 g) del EJEMPLO 6 se adicionó a 100L de una solución de replegado optimizada preenfriada a 4 °C.

[000184] Este proceso se programó para una hora utilizando una bomba peristáltica Cole-Parmer ajustada en 73 ml/min. Este proceso tuvo lugar en una cámara frigorífica a 4°C.

[000185] La solución de agente amortiguador optimizada produjo una cantidad más grande de SEQ ID NO: 15 con relación a agregados de SEQ ID NO: 15 (figuras 19-20). El uso de la solución de replegado inicial produjo aproximadamente 10%-15% de SEQ ID NO: 15 correctamente replegada. El uso de la solución de replegado optimizada produjo aproximadamente 45%-55% de SEQ ID NO: 15 correctamente replegada.

EJEMPLO 8

Concentración de proteínas e intercambio de agente amortiguador por TFF UF/DF

[000186] Este ejemplo demuestra la concentración de proteínas y el intercambio de agente amortiguador utilizando filtración de flujo tangencial (TFF) con base en ultrafiltración/diafiltración (UF/DF).

[000187] Proteína replegada (por ejemplo, SEQ ID NO: 15) se procesó por el sistema de TFF (Millipore) para concentrarlo 10 veces y el intercambio de agente amortiguador 5 veces. El proceso se realizó por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) utilizando cuatro casetes de lámina plana MWCO Millipore Ultracell Pellican3 de 1.14 m² TFF de 10 kDa. El agente amortiguador de diafiltración consistió en Tris-base 20 mM a pH 7.5 y NaCl 100 mM. El volumen final en el final del proceso de UF/DF era de 10L. Este material se filtró posteriormente utilizando un sistema de filtración de flujo que empleaba un filtro AkroPac de 0.8/0.2 μ m por Pall Corporation y una tubería y bomba peristáltica Cole-Parmer. El ensayo de Bradford se realizó para determinar la concentración de proteínas, rendimiento, y recuperación de paso. En este punto, se realizó un SEC-HPLC cuantitativo para determinar la cantidad de la proteína correctamente plegada con SEQ ID NO: 15 presente en las muestras de replegado y UF/DF. Una BSA comercialmente disponible de una concentración conocida se utilizó como norma de referencia a partir de la cual se generó la curva estándar para el ensayo de Bradford. Se utilizaron el sistema HPLC Agilent 1100 y la columna TSKgel SuperSW3000, 4 μ m, 4.6 mm Diámetro interno x 30.0 cm L (Tosoh Bioscience, 18675). Con base en este ensayo cuantitativo, se determinó la eficiencia del replegado.

[000188] Los datos muestran que el replegado de proteínas se puede realizar utilizando el intercambio de agente amortiguador y TFF UF/DF.

EJEMPLO 9

Cromatografía de proteínas utilizando la resina NH₂-750F^{MR} del paso de Captura

[000189] Este ejemplo demuestra los pasos de captura en

la cromatografía de intercambio aniónico de proteína utilizando la resina NH₂-750F^{MR}.

[000190] Los sistemas AKTA Avant 150 o AKTA Pilot FPLC de columnas de General Electric (GE) se utilizaron para cromatografía de proteínas. La resina NH₂-750F^{MR} de intercambio aniónico de Tosoh se utilizó para envasar una columna con una altura mínima de lecho de al menos 20 cm y garantizar un volumen de columna que facilitaría una capacidad de unión dinámica de 20-25 g/L. Un agente amortiguador de acetato de sodio 20 mM, pH 4.5 o citrato de sodio 20 mM, pH 4.5 se utilizaron para envasar la columna. Los agentes amortiguadores utilizados eran como sigue: agente amortiguador A: Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 0.5 M; agente amortiguador B: Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 2.0 M. La columna de NH₂-750F entonces se limpió con una solución de NaOH 0.5 M con un tiempo de contacto de 30 minutos, y entonces se equilibró con el agente amortiguador A para al menos 3 volúmenes de columna (CV), o hasta que el pH y la conductividad alcancen líneas estables en los valores esperados (pH 7.5-pH 7.7, ~49 mS/cm +/- 1 mS/cm).

[000191] Antes de cargarse en la columna, la solución de proteínas de UF/DF (SEQ ID NO: 15) se complementó con NaCl 0.4 M al adicionar una solución madre de 5 M y se midió la conductividad para garantizar la conductividad de 49 mS/cm +/- 2 mS/cm). La solución de proteínas (SEQ ID NO: 15) se cargó en la columna con una velocidad de flujo de un mínimo de 5 minutos de tiempo de residencia de columna, y se recolectó el flujo pasante. La columna se lavó con 3 CV de agente amortiguador A o hasta que retornó la absorbancia a 280 nm, y era estable en la línea base, cerca de 0.0 mAu a 280 nm. En este punto se realizó un gradiente lineal de 20 CV de 0.0-62.5%B, seguido por un gradiente de paso a 100%B para 5 CV adicionales. Las fracciones se recolectaron

de principio a fin y sus volúmenes no eran mayores que 0.5 del volumen de columna. Las muestras de diferentes fracciones se analizaron por SDS-PAGE utilizando el sistema de formación de imágenes Bio-Rad ChemiDoc^{MR} MP, y las fracciones que contenían más de 90% de SEQ ID NO: 15 se mezclaron y designaron como mezcla NH₂-750F. La concentración de proteínas de la mezcla NH₂-750F se midió utilizando el Nanodrop One de Thermo Fisher^{MR}, por la lectura de la absorbancia a 280 nm (A280) considerando un coeficiente de extinción de 1.22 para SEQ ID NO: 15 y una relación de 260/280 nm de <0.6. La mezcla NH₂-750F contiene aproximadamente 1.0 M de NaCl.

[000192] Un cromatograma de ejemplo después de la purificación de NH₂-750F de SEQ ID NO: 15 se muestra en la figura 21A para una altura de lecho de 20 cm y un volumen de columna de 10 mL y la figura 21B para una altura de lecho de 30 cm y un volumen de columna de 4.6 mL.

[000193] Un resumen de la purificación de NH₂-750F se muestra en la Tabla 4 para SEQ ID NO: 15 y la Tabla 5 para SEQ ID NO: 14, que se produjo, replegó, y purificó en general de una manera análoga a SEQ ID NO: 15.

Tabla 4 - Resumen de Purificación de NH₂-750F de SEQ ID NO: 15

SEQ ID NO: 15	
Agente Amortiguador A	Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 0.5 M.
Agente Amortiguador B	Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 2.0 M.
Altura de lecho	Mínimo 20 cm

Tiempo de residencia	5.0 minutos
Gradiente	0.0 - 62.5%B, 20 CV
Capacidad de unión	20-25 g/L (Avance a 40 g/L)
Pureza	93-96%
Recuperación	71-76%
Endotoxina	< 1.0 EU/mg

Tabla 5 - Resumen de Purificación de NH₂-750F de SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 14	
Agente Amortiguador A	Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 0.7 M, 10% de glicerol
Agente Amortiguador B	Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 2.0 M., 10% de glicerol
Altura de lecho	Mínimo 20 cm
Tiempo de residencia	5.0 minutos
Gradiente	0.0 - 62.5%B, 20 CV
Capacidad de unión	20-25 g/L
Pureza	≥93-96%
Recuperación	80-93%
Endotoxina	< 1.0 EU/mg

EJEMPLO 10

Cromatografía de proteínas utilizando el procedimiento de CaPure^{MR}

[000194] Este ejemplo demuestra un paso de purificación de pulido en la cromatografía de proteínas utilizando el procedimiento de CaPure^{MR}.

[000195] Los sistemas AKTA Avant 150 o AKTA Pilot FPLC de columnas de General Electric (GE) se utilizaron para cromatografía de proteínas de las proteínas de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 14. La resina de modo mezclado de hidroxapatita Tosoh CaPure^{MR} se utilizó para envasar una columna para cada uno de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 14 con una altura mínima de lecho de al menos 10 cm y garantizar un volumen de columna que facilitaría una capacidad de unión dinámica de máximo 20 g/L. Los agentes amortiguadores utilizados fueron como sigue para SEQ ID NO: 15: agente amortiguador A: Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1 mM; agente amortiguador B: fosfato de sodio 200 mM a pH 7.0, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1mM. Los agentes amortiguadores utilizados fueron como sigue para SEQ ID NO: 14: agente amortiguador A: Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1 mM; agente amortiguador B: fosfato de sodio 200 mM a pH 7.0, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1mM. Cada columna de CaPure^{MR} entonces se limpió con 0.5 M de NaOH con un tiempo de contacto de 30 minutos o más, y entonces se equilibró con el agente amortiguador A para al menos 3 volúmenes de columna (CV), o hasta que el pH y la conductividad alcancen líneas estables en los valores esperados (pH 7.5–pH 7.7, ~11 mS/cm +/- 1 mS/cm). No hubo la necesidad de tratar la mezcla NH₂-750F antes de cargarla en la columna. Esto redujo significativamente la pérdida de proteínas, el tiempo, y los recursos. La mezcla NH₂-750F se cargó en la columna con una velocidad de flujo de un mínimo de 5 minutos de tiempo de residencia de columna, y se recolectó el flujo pasante. La columna se lavó con 3 CV de agente amortiguador A o hasta que retornó la absorbancia a 280

nm, y era estable en la línea base, cerca de 0.0 mAu. En este punto, se realizó un gradiente lineal de 25 CV de 0-25%B, seguido por un gradiente de paso a 100%B para 5 CV adicionales. Las fracciones se recolectaron de principio a fin y sus volúmenes variaron de 0.36 a 1.43 del volumen de columna, dependiendo del perfil de elución. Se analizaron muestras de diferentes fracciones por SDS-PAGE utilizando el sistema de formación de imágenes ChemiDoc^{MR} MP, y las fracciones que contenían más de 95% de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 14 se mezclaron y designaron como mezcla CaPure. La concentración de proteínas de la mezcla CaPure se midió utilizando el Nanodrop One^{MR} de Thermo Fisher, por la lectura de la absorbancia a 280 nm (A280) considerando un coeficiente de extinción de 1.22 para SEQ ID NO: 15 y una relación de 260/280 nm de <0.6.

[000196] Un cromatograma de ejemplo después de la purificación de CaPure^{MR} de SEQ ID NO: 15 se muestra en la figura 22A para una altura de lecho de 10 cm y volumen de columna de 5 mL y la figura 22B para una altura de lecho de 21 cm y un volumen de columna de 800 mL.

[000197] Un resumen de la purificación de CaPure^{MR} se muestra en la Tabla 6 para SEQ ID NO: 15 y la Tabla 7 para SEQ ID NO: 14.

Tabla 6 - Resumen de Purificación de CaPure de SEQ ID NO: 15

SEQ ID NO: 15	
Agente Amortiguador A	Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 100 mM, CaCl ₂ 1mM
Agente Amortiguador B	fosfato de sodio 200 mM a pH 7.0, NaCl 100 mM, CaCl ₂ 1mM

Altura de lecho	20 cm
Tiempo de residencia	5.0 minutos
Gradiente	0.0 - 25%B, 25 CV
Capacidad de unión	20 g/L
Pureza	>98%
Recuperación	>92%
Endotoxina	< 1.0 EU/mg

Tabla 7 - Resumen de Purificación de CaPure de SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 14	
Agente Amortiguador A	Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 100 mM, CaCl ₂ 1mM
Agente Amortiguador B	fosfato de sodio 200 mM a pH 7.0, NaCl 100 mM, CaCl ₂ 1mM
Altura de lecho	20 cm
Tiempo de residencia	5.0 minutos
Gradiente	0.0 - 25%B, 25 CV
Capacidad de unión	20 g/L
Pureza	>98%
Recuperación	>92%
Endotoxina	< 1.0 EU/mg

EJEMPLO 11

Concentración de proteínas por TFF UF/DF

[000198] Este ejemplo demuestra la formulación de proteínas por procedimientos de TFF UF/DF.

[000199] La mezcla CaPure^{MR} se concentró por un sistema de TFF (Pall corporation) a una concentración final de 20 mg/mL seguido por el intercambio de agente amortiguador de 5 veces. El proceso se llevó a cabo por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) utilizando tres casetes de lámina plana de TFF de 10 kDa MWCO Millipore Pellican3, de 0.114 m². El agente amortiguador de diafiltración consistió en fosfato de sodio 10 mM a pH7.0, NaCl 100 mM. La SEQ ID NO: 15 formulada se filtró posteriormente utilizando un sistema de filtración de flujo que empleaba un filtro AkroPac de 0.8/0.2 um por Pall Corporation y una tubería y bomba peristáltica Cole-Parmer. La SEQ ID NO: 15 formulada entonces se almacenó en alícuotas a -80 °C y se realizaron los siguientes análisis para garantizar su calidad biofísica: (1) Concentración de proteínas (por ejemplo, SEQ ID NO: 15) a 20 mg/mL al medir la absorbancia a 280 nm con una relación de 260/280 <0.6 utilizando el Nanodrop One^{MR} de Thermo Fisher y al considerar un coeficiente de extinción de proteínas de 1.22; (2) niveles de endotoxinas de LAL por debajo de 1.0 Eu/mg medido por el equipo de Charles River Laboratories; (3) Pureza por SEC-HPLC por encima de 97% de pureza (habitualmente >98%) utilizando la columna TSKgel GW3000SWXL, 5µm, 7.8 mm ID x 30.0 cm L (Tosoh Bioscience, 8541) (4) Análisis SDS-PAGE utilizando el aparato de gel Bio-Rad y su sistema de formación de imágenes ChemiDoc^{MR} MP asociado.

EJEMPLO 12

Evaluación de actividad in vivo de moléculas de fusión purificadas

[000200] Este ejemplo demuestra métodos para verificar el plegado apropiado de las moléculas de fusión con respecto a su capacidad para transportar una carga biológicamente activa a través de un epitelio intacto.

[000201] La proteína de fusión con SEQ ID NO: 15 se expresa por E. coli y se recolecta de los cuerpos de inclusión y se pliega utilizando un sistema de agente amortiguador de intercambio aleatorio, como se describe en el EJEMPLO 8 anterior. El material resultante se purifica de acuerdo con los métodos descritos en el EJEMPLO 9 y el EJEMPLO 10, y como se resume, por ejemplo, en las Tablas 4-7, dependiendo de las características moleculares de la molécula de fusión. La preparación tiene una pureza de proteína de ~98% con base en SDS PAGE. Las células epiteliales se tratan con la molécula de fusión que tiene SEQ ID NO: 15 a concentraciones de 25 nM y 250 nM. En comparación a las células coincidadas no tratadas, las células tratadas de SEQ ID NO: 15 producen una disminución dependiendo de la dosis en el número de células como se evalúa por citometría de flujo de células vivas/muertas). Los valores representan $n=4 \pm$ desviación estándar.

EJEMPLO 13

Aumento en escala de purificación de proteínas de fusión

[000202] Este ejemplo demuestra un aumento en escala de un método de purificación que utiliza la proteína de fusión de SEQ ID NO: 15 (figuras 7A y 7B).

[000203] La proteína de fusión con SEQ ID NO: 15 se purificó en dos escalas diferentes.

[000204] La primera purificación se llevó a cabo utilizando una columna en cromatografía con un volumen de 10 mL envasada con resina NH₂-750FMR y los siguientes parámetros: Altura del lecho: 20 cm, tiempo de residencia: 5 min (velocidad de flujo: 2 mL/min), agente amortiguador

A: Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 0.5 mM; agente amortiguador
 B: Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 2 M, y utilizando el siguiente
 gradiente: 0.0-62.5% B para 20 volúmenes de columna (CV).
 La proteína de fusión con SEQ ID NO: 15 se obtuvo con una
 pureza de 93-96%, una recuperación de >71%, y niveles de
 endotoxinas de <1.0 EU/mg.

[000205] La segunda purificación se realizó utilizando
 una columna en cromatografía con un volumen de 4.6 L
 envasada con resina NH2-750FMR y los siguientes
 parámetros: Altura del lecho: 30 cm, tiempo de residencia:
 11.55 min (velocidad de flujo: 400 mL/min), agente
 amortiguador A: Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 0.5 mM; agente
 amortiguador B: Tris 20 mM a pH 7.5, NaCl 2 M, y utilizando
 el siguiente gradiente: 0.0-62.5% B para 20 volúmenes de
 columna (CV). La proteína de fusión con SEQ ID NO: 15 se
 obtuvo con una pureza de 93-96%, una recuperación de >71%,
 y niveles de endotoxinas de <1.0 EU/mg.

EJEMPLO 14

Consistencia entre las recuperaciones de paso de proceso

[000206] El proceso de purificación se llevó a cabo para
 purificar la proteína de fusión de SEQ ID NO: 15 cuatro
 veces (lotes 1-4), y la recuperación de esta proteína de
 fusión se evaluó después de cada etapa del proceso de
 purificación (TABLA 8). Hubo un alto grado de consistencia
 en la recuperación de la proteína de fusión entre estas
 réplicas.

Tabla 8. Recuperación de la proteína de fusión de SEQ ID
 NO: 15 en 4 procesos de purificación de réplicas

Paso de proceso	Descripción de proceso	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Promedio (%)
2	UF/DF de replegado	98.60 %	94%	92.40 %	85%	92

3	NH ₂ -750F	68.60 %	66.30 %	76%	74.50 %	71.35 %
4	CaPure	99%	96.40 %	100%	94.80 %	97.55
5	UF/DF de formulación	97.80 %	100%	98.75 %	100%	99.14

[000207] Estos datos demuestran que los métodos y composiciones de la presente descripción permitieron la producción y purificación de la proteína de fusión terapéutica a gran escala, y que los métodos y composiciones descritos en la presente proporcionaron alta consistencia durante el aumento en escala.

[000208] Todos los métodos descritos y reivindicados en la presente se pueden realizar y ejecutar sin experimentos indebidos a la luz de la presente descripción. En tanto que las composiciones y métodos de esta descripción se han descrito en términos de formas de realización preferidas, será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos del método descrito en la presente sin desviarse del concepto, espíritu y alcance de la descripción. Más en específico, será evidente que ciertos agentes que se relacionan de manera química y fisiológicamente se pueden sustituir por los agentes descritos en la presente, en tanto que se lograrían los mismos resultados o similares. Todos estos sustitutos similares y modificaciones aparentes para aquellos expertos en la técnica se considera que están dentro del espíritu, alcance y concepto de la descripción como se define en las reivindicaciones anexas.

EJEMPLO 15

La Comparación de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17

[000209] La cromatografía líquida-espectrofotometría de

masas (LC-MS) se realizó en composiciones purificadas que representan SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17, y los resultados se representan en la figura 23B y figura 23A, respectivamente. La composición de SEQ ID NO: 17 se produjo, replegó, y purificó de una manera análoga a esa descrita anteriormente con relación a la composición de SEQ ID NO: 15.

EJEMPLO 16

Evaluación in vivo de constructos de suministro

[000210] Este ejemplo describe una evaluación in vivo de un constructo de suministro que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15 en comparación al vehículo.

[000211] La figura 24 muestra una vista general de estudio (dosis individual) para evaluar el transporte del constructo de suministro que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15 a través del epitelio intestinal y hacia la circulación después de la administración oral (abreviada en la presente como P.O.) del constructo. Los animales utilizados en estos experimentos eran ratones macho de CD-1 sin ayunar. Un criterio de valoración primario de estudio era la exposición total a la IL-22 de plasma, y un criterio de valoración secundario eran los biomarcadores de plasma, incluyendo la proteína de unión a IL-22 (por ejemplo, IL-22BP).

[000212] La Tabla 9 proporciona detalles con respecto a la configuración experimental, incluyendo información con respecto al constructo de suministro de líquido (no formulado) y el vehículo.

TABLA 9 - Configuración Experimental del Estudio In Vivo

Grupo	Artículo de prueba	Vehículo	Formulación	Dosis (mpk)	Ruta	N (4/dos TP)	Puntos de tiempo

							(horas)
1	Vehículo	PBS, pH 7	Bolo acuoso	na	P.O.	4	1
2	SEQ ID NO: 15 (líquido)	PBS, pH 7	Bolo acuoso	90	P.O.	8 (4*2)	1, 2, 4, 6

[000213] La Tabla 10 resume las propiedades del constructo de SEQ ID NO: 15 como se administró en este experimento.

Tabla 10 - Propiedades de constructo de suministro como se administró en forma líquida

Grupos	Grupos	Cmax (pg/mL)	Tmax (hr)	AUC (0- 6hr)
SEQ ID NO: 15- líquido	N/A	24488	2	58126

[000214] La exposición total a la IL-22 de plasma se midió en los respectivos puntos de tiempo mostrados en la Tabla 9. **La** figura 25A muestra la exposición sistémica total a la IL-22 (en pg/mL) y la figura 25B muestra la exposición a la IL-22BP (en pg/mL) en los varios puntos de tiempo donde se tomaron las muestras de sangre y las mediciones. **La figura** 26A - figura 26B muestran mediciones individuales y puntos de datos para cada grupo probado en este estudio.

[000215] Se observó que el constructo de suministro administrado por vía oral que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15 proporcionó IL-22 en el plasma.

EJEMPLO 17

La longitud del espaciador y el acoplamiento de carga útil al extremo N o C de un portador no afecta significativamente la actividad biológica de la carga útil

[000216] Este ejemplo muestra que los ligadores de aminoácidos de varias longitudes y el acoplamiento de una carga útil heteróloga al extremo N de un portador no impactan significativamente a la capacidad de la carga útil para unirse a su diana cuando se incluye en un constructo de suministro. Los ligadores de aminoácidos examinados eran SEQ ID NO: 13 (GGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 28 (GGGS), y SEQ ID NO: 31 (GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS).

[000217] El ensayo de dimerización de receptor de IL-22 se realizó al sembrar células HEK293 DiscoverX e incubar las células durante 16 h (5,000 células por concavidad) utilizando las concentraciones mostradas de agonista (constructo de suministro que contiene la carga útil de IL-22). La luminiscencia de criterio de valoración se leyó en un lector de placas utilizando el Ensayo de Dimerización PathHunter^{MR} eXpress IL22RA1/IL10RB.

[000218] La figura 27A muestra que la longitud de los espaciadores de aminoácidos con SEQ ID NO: 13, 28 y 31 no impactó a la capacidad de IL-22 (NO de SEQ ID: 11) cuando se incluye en los constructos de suministro con SEQ ID NO: 15, 32 y 33 para inducir la dimerización de receptor de IL-22. La inducción de la dimerización de receptor de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) se muestra en la curva negra.

[000219] La figura 27B muestra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) al extremo N o al extremo C del portador que comprende residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 mediante el espaciador con SEQ ID NO: 28 no cambió significativamente la capacidad de los constructos de suministro SEQ ID NO: 32, 34 y 35 para inducir la dimerización de receptor de IL-22. La inducción de la dimerización de receptor de IL-22 humana

recombinante de control (rhIL-22) se muestra en la curva negra.

[000220] El ensayo de activación de pSTAT3 se llevó a cabo utilizando células de Colo205 incubadas con 10 µL de agonista (el respectivo constructo de suministro o control de IL-22) que tenían las diversas concentraciones durante 15 min. El grado de activación de pSTAT3 entonces se leyó utilizando placas MSD STAT3 (Cat. No. N450SMA-1).

[000221] La figura 27C muestra que la longitud de los espaciadores de aminoácidos con SEQ ID NO: 13, 28 y 31 no impactó a la capacidad de IL-22 (NO de SEQ ID: 11) cuando se incluye en los constructos de suministro con SEQ ID NO: 15, 32 y 33 para inducir la activación de pSTAT3. La activación de pSTAT3 de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) se muestra en la curva negra.

[000222] La figura 27D muestra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) al extremo N o al extremo C del portador que comprende residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 mediante el espaciador con SEQ ID NO: 28 no cambió significativamente la capacidad de los constructos de suministro SEQ ID NO: 32, 34 y 35 para inducir la activación de pSTAT3. La activación de pSTAT3 de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22) se muestra en la curva negra.

