

DERIVADOS TERAPÉUTICOS DE INTERLEUCINA-22

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos derivados de interleucina-22 (IL-22) y, en particular, a derivados que comprenden un ácido graso unido de forma covalente a una proteína IL-22. La invención también abarca métodos para su producción y su uso en terapia, que incluye el tratamiento, prevención y mejora de enfermedades, trastornos y afecciones metabólicas, hepáticas, pulmonares, intestinales, renales y de la piel.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

IL-22 es una proteína de 146 aminoácidos con un peso molecular de 17 KDa. Pertenece a la familia de citocinas IL-10 y activa selectivamente un receptor heterodimérico que consiste en una subunidad B del receptor IL-10 (IL-10RA2), que se expresa de forma ubicua, y una subunidad A del receptor IL-22 (IL-22RA1), que tiene una expresión epitelial restringida. Es una citocina única en el sentido de que se libera de las células inmunitarias, pero se dirige selectivamente a las células epiteliales. Por lo tanto, las vías de señalización inducidas por IL-22 pueden tener relevancia en diferentes tejidos (los objetivos incluyen piel, intestino, pulmón, hígado, riñón, páncreas y timo), pero la IL-22 los activa de manera específica del epitelial. Una proteína de unión soluble, IL-22BP, neutraliza la IL-22 y, por lo tanto, regula su efecto.

La IL-22 se libera como respuesta a señales que reflejan una lesión química o mecánica, por ejemplo, la activación del receptor de hidrocarburo de arilo en respuesta a toxinas ambientales o intermediarios de triptófano, y la activación de receptores de reconocimiento de patrones, tal como el receptor tipo toll 4, en respuesta a proteínas, fragmentos y desechos de células moribundas o patógenos invasores. La liberación de IL-22 es estimulada aún más por determinadas citocinas, en particular IL-23 y, en menor medida, IL-1 β . Por lo tanto, la IL-22 se secreta como respuesta a señales que reflejan la infección por patógenos y también la activación inmunitaria.

El efecto de IL-22 es el resultado de una participación orquestada de varias actividades/vías. La IL-22 actúa sobre los tejidos y órganos de la barrera epitelial tras una lesión para proteger las células y mantener la función de barrera (por ejemplo, mediante la activación de programas genéticos antiapoptóticos). También acelera la

reparación (por ejemplo, al inducir la proliferación de células maduras y la activación de células madre), previene la fibrosis (por ejemplo, al reducir la transición epitelial-mesenquimatoso, antagoniza el inflammasoma NLRP3 e induce la senescencia de las células estrelladas hepáticas) y controla la inflamación (por ejemplo, al inducir péptidos anti-microbianos y señales de quimiotaxis). Se ha informado que la IL-22 es capaz de tratar una variedad de afecciones médicas, que incluye las que se observan a menudo en mamíferos diabéticos o con sobrepeso, tal como la hiperglucemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia.

Sin embargo, la IL-22 generalmente se elimina rápidamente del cuerpo por los riñones, lo que limita su uso en la práctica clínica. Por lo tanto, los métodos conocidos para extender la semivida de la IL-22 circulante buscan aumentar artificialmente el tamaño de la IL-22 más allá de 70 kDa, para evitar la depuración renal. Ligar IL-22 a un fragmento de anticuerpo Fc es actualmente la mejor solución a este efecto; Genentech y Generon Shanghai tienen fusiones IL-22-Fc de acción prolongada en desarrollo clínico. La modificación de IL-22 con polietilenglicol (PEGilación) es otro medio conocido para evitar la depuración renal.

Sin embargo, estas soluciones existentes no están exentas de desventajas. Los datos disponibles sugieren que el propio PEG es inmunogénico y que se observan vacuolas que contienen PEG en células con productos biológicos PEGilados. La disminución de la actividad y la heterogeneidad también son aspectos desfavorables de la PEGilación. Aunque la tecnología de fusión Fc es muy conocida, agregar un fragmento de anticuerpo Fc representa un cambio importante en la estructura de la IL-22, que afecta sus propiedades más allá de la extensión de la semivida. A medida que la fusión de Fc aumenta el tamaño de la proteína desde aproximadamente 17 kDa hasta aproximadamente 85 kDa, pueden verse afectadas propiedades tales como la velocidad de difusión, distribución y cinética de participación del receptor. Por ejemplo, algunas fusiones de Fc se absorben lentamente y/o son demasiado grandes para la administración a través de determinadas vías. Tanto Genentech como Generon también informan reacciones cutáneas moderadas y reversibles como efectos adversos

limitantes de la dosis de las fusiones IL-22-Fc. Además, la potencia puede verse afectada por el impedimento estérico causado por el compañero de fusión grande.

Por lo tanto, permanece en la técnica la necesidad de nuevos modificadores biocompatibles de IL-22 que mejoren las semividas circulantes y demuestren propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas optimizadas en comparación con la molécula nativa. Idealmente, deberían mantener la potencia y otras propiedades de la molécula nativa y también evitar la toxicidad, la inmunogenicidad y cualquier otra reacción adversa demostrada por los derivados conocidos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, se proporciona un derivado de IL-22 que comprende un ácido graso unido de forma covalente a una proteína IL-22.

En modalidades de la invención, el ácido graso se une de forma covalente a la proteína IL-22 mediante un enlazador.

El ácido graso puede ser de Fórmula I:

$$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*,$$

donde x es un número entero en el intervalo de 10-18, opcionalmente 12-18, 14-16 o 16-18, y * designa un punto de unión a la proteína IL-22 o enlazador. Puede ser un diácido graso, tal como un diácido C12, C14, C16, C18 o C20. De forma ventajosa, el ácido graso es un diácido C16 o C18, y más ventajosamente es un diácido C18.

La proteína IL-22 puede ser IL-22 humana madura nativa (en adelante "hIL-22") o una variante de esta. La variante puede ser una forma sustituida de hIL-22, opcionalmente sustituida en la posición 1, 21, 35, 64, 113 y/o 114. Puede comprender una sustitución de hIL-22 seleccionada del grupo que consiste en A1C, A1G, A1H, N21C, N21D, N21Q, N35C, N35D, N35H, N35Q, N64C, N64D, N64Q, N64W, Q113C, Q113R, K114C y K114R. De manera ventajosa, la variante comprende un residuo Cys en la posición 1 de hIL-22.

La variante puede ser una forma extendida de hIL-22. Puede comprender un péptido de extremo N, tal como un trímero de extremo N. De manera ventajosa, la variante comprende una G-P-G de extremo N.

El enlazador puede comprender uno o más aminoácidos, que incluye opcionalmente ácido glutámico (Glu) y/o lisina (Lys). El enlazador puede incluir una unidad de oxietilenglicina o unidades de oxietilenglicina de múltiples enlaces, opcionalmente 2-5 de tales unidades, de manera ventajosa, 2 unidades. El enlazador puede comprender uno o más residuos de oligo(etilenglicol) (OEG). Puede comprender un grupo etilendiamina (C₂DA) y/o un grupo acetamida (Ac). De manera ventajosa, el enlazador comprende todos los elementos mencionados en combinación. En particular, el enlazador puede ser γ Glu-OEG-OEG-C₂DA-Ac, γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu-OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac o γ Glu-OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac.

El enlazador puede ser un enlazador reactivo con Cys unido a un residuo de Cys en la hIL-22 o variante de este. Puede unirse en la posición -7, -5, 1, 6, 33, 113, 114 o 153 de la hIL-22 o variante de esta (donde las posiciones -7, -5, etc. son como se definen en la presente). A modo de ejemplo, el enlazador se puede unir a un residuo Cys sustituido en la posición 1, 6, 33, 113 o 114 de hIL-22. Puede estar unido a un residuo Cys en la posición -5, -7 o 153 con respecto a hIL-22. De manera ventajosa, el enlazador está unido a un residuo Cys sustituido en la posición 1 de hIL-22.

En una modalidad, el derivado comprende un diácido C14, C16, C18 o C20 unido de forma covalente por un enlazador a una variante de hIL-22, donde la variante comprende un G-P-G de extremo N y un residuo Cys en la posición 1 de hIL-22 y el enlazador está opcionalmente unido a dicho residuo Cys. Derivados de ejemplo de la invención son aquellos identificados en la presente como derivados 1-10.

En un segundo aspecto, se proporciona un proceso para preparar un derivado del primer aspecto que comprende unir de forma covalente un ácido graso a una proteína IL-22.

En un tercer aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un derivado del primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un cuarto aspecto, se proporciona un derivado del primer aspecto o una composición farmacéutica del tercer aspecto, para usar en terapia.

En un quinto aspecto, se proporciona un derivado del primer aspecto o una composición farmacéutica del tercer aspecto, para usar en un método para tratar una

enfermedad, trastorno o afección metabólica, hepática, pulmonar, intestinal, renal o cutánea.

La enfermedad, trastorno o afección metabólica puede ser obesidad, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hiperglucemia o hiperinsulinemia.

5 La enfermedad, trastorno o afección hepática pueden ser enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por su sigla en inglés), esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por su sigla en inglés), cirrosis, hepatitis alcohólica, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática crónica, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF, por su sigla en inglés), lesión hepática aguda, toxicidad hepática inducida por
10 acetaminofeno, colangitis esclerosante, cirrosis biliar o una condición patológica causada por cirugía o trasplante.

La enfermedad, trastorno o afección pulmonar puede ser enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, bronquiectasias, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de dificultad respiratoria aguda, una lesión química, una infección
15 vírica, una infección bacteriana o una infección fúngica.

La enfermedad, trastorno o afección intestinal puede ser enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por su sigla en inglés), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), una lesión química, una infección viral o una infección bacteriana.

20 La enfermedad, trastorno o afección renal puede ser una enfermedad renal aguda o una enfermedad renal crónica.

La enfermedad, trastorno o afección de la piel puede ser una herida, enfermedad inflamatoria o GvHD.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 ilustra un (A) diácido C18, (B) diácido C16 y (C) diácido C14, cada uno conectado a un enlazador que comprende una unidad reactiva Cys. Estas combinaciones de ácidos grasos y enlazadores se emplean en los derivados de la invención identificados en la presente como Derivados 1-10.

La Figura 2 ilustra la estructura de un derivado de la invención identificado en la
30 presente como Derivado 1.

La Figura 3 ilustra la estructura de un derivado de la invención identificado en la presente como Derivado 6.

La Figura 4 ilustra la estructura de un derivado de la invención identificado en la presente como Derivado 10.

5 La Figura 5 ilustra el efecto de la dosificación diaria de hIL-22 y una variante comparativa de IL-22 que tiene solo variaciones de la estructura principal (identificada en la presente como Comparador 3) sobre la glucosa en sangre en un estudio de 8 días en un modelo de ratón con diabetes (media $\pm$ SEM).

10 La Figura 6 ilustra el efecto de la dosificación diaria de un derivado de la invención (identificado la presente como Derivado 1) en comparación con una fusión de IL-22-Fc (específicamente una Fc humana fusionada en el extremo N a hIL-22; en adelante “hFc-hIL- 22”) en (A) glucosa en sangre y (B) ingesta de alimentos, en un estudio de 16 días en un modelo de ratón con diabetes (media $\pm$ SEM; * significa $p < 0,05$ usando una prueba t no emparejada).

15 Las Figuras 7A-C ilustran el efecto de la dosificación diaria del Derivado 1 y hFc-hIL-22 en tres biomarcadores de participación objetivo diferentes, en un estudio de 16 días en un modelo de ratón con diabetes (media $\pm$ SEM; *** significa (A) $p < 0,0002$, (B) $p < 0,0003$ o (C) $p < 0,0026$ usando una prueba t no emparejada).

20 La Figura 8 ilustra una curva de dosis-respuesta para la dosificación diaria de un derivado de la invención (identificado en la presente como Derivado 6) (tres dosis diferentes) en comparación con el Derivado 1 y hFc-hIL-22 sobre glucosa en sangre en un estudio de 13 días en un modelo de ratón con diabetes (media $\pm$ SEM).

25 Las Figuras 9A y B ilustran el efecto de los Derivados 1 y 6 en la prevención del daño hepático en un modelo de ratón con daño hepático inducido por acetaminofeno (APAP, por su sigla en inglés), como lo demuestran los niveles de plasma de dos enzimas hepáticas diferentes. Utilizando el modelo lineal de un factor de la prueba de Dunnett, * significa $p < 0,05$ y ** significa $p < 0,01$ en comparación con vehículo + APAP.

30 La Figura 10 ilustra el efecto de los Derivados 1 y 6, (A) en la prevención de la apoptosis y (B) en la proliferación celular, en un modelo de ratón con daño hepático inducido por APAP. NS significa no significativo.

La Figura 11 ilustra el efecto del Derivado 6 para prevenir y/o reducir (A) la inflamación pulmonar y (B) y (C) la fibrosis pulmonar, en un modelo de rata con lesión pulmonar inducida por bleomicina, en comparación con prednisolona.

La Figura 12 ilustra el efecto del Derivado 6 en la prevención de la inflamación del colon en un modelo de ratón con colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS). **** significa $p < 0,0001$ en comparación con el vehículo (que contiene DSS).

La Figura 13 ilustra el efecto del Derivado 6 en comparación con hFc-hIL-22 en la prevención de heridas en el epitelio de la mucosa en el modelo de ratón con colitis inducida por DSS. Aumento 4x, barra de escala = 500 μ m.

La Figura 14 ilustra los niveles de plasma de proteína 3 gamma derivada de islotes regeneradores (Reg3g) en el modelo de ratón con colitis inducida por DSS, como una medida de participación objetivo (Reg3g es un marcador de participación objetivo de IL-22).

Las Figuras 15A y B ilustran el efecto del Derivado 1 en la prevención del daño hepático en un modelo de ratón con daño hepático inducido por Concanavalina A (ConA), como lo demuestran los niveles de suero de dos enzimas hepáticas diferentes.

La Figura 16 ilustra el efecto del Derivado 6 en comparación con hFc-hIL-22 y el conocido derivado de GLP-1 conjugado con ácido graso, semaglutida, sobre el peso corporal en ratones obesos inducidos por dieta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En lo que sigue, las letras griegas están representadas por su símbolo en lugar de su nombre escrito. Por ejemplo, α = alfa, ε = épsilon, γ = gamma y μ = mu. Los residuos de aminoácidos pueden identificarse por su nombre completo, código de tres letras o código de una letra, todos los cuales son completamente equivalentes.

El término "derivado de IL-22", tal como se usa en la presente, se refiere a una proteína IL-22 que tiene un ácido graso unido de forma covalente. El término abarca tanto los derivados en los que el ácido graso se une de forma covalente a la proteína IL-22 directamente como aquellos en los que la unión covalente se realiza mediante un enlazador.

La unión covalente de ácidos grasos es una tecnología comprobada para la extensión de la semivida de péptidos y proteínas y es una forma de hacer subyacer un ácido graso del péptido o proteína. Se conoce a partir de productos comercializados para la diabetes tipo 1 y 2, tal como las insulinas Levemir® (detemir) y Tresiba® (degludec), y los derivados del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) Victoza® (liraglutida) y Ozempic® (semaglutida).

La unión de ácidos grasos permite la unión a la albúmina, lo que evita la excreción renal y proporciona cierta protección estérica contra la proteólisis. De forma ventajosa, ofrece una modificación mínima a IL-22 en comparación con la fusión Fc o la PEGilación. En este sentido, mientras que la fusión Fc y la PEGilación tienen como objetivo aumentar el tamaño de la IL-22 más allá del umbral de eliminación renal, los derivados que comprenden un ácido graso unido de forma covalente a una proteína IL-22 conservan un tamaño pequeño similar al de la proteína IL-22. Por lo tanto, dado que la unión del ácido graso es una modificación mínima, se cree que el derivado resultante mantiene propiedades similares a las nativas, incluida la distribución, la tasa de difusión y la participación del receptor (unión, activación y tráfico) y minimiza el riesgo de inmunogenicidad.

Como anteriormente, la unión de ácidos grasos ha demostrado eficacia terapéutica en derivados de insulina y GLP-1 para la diabetes. Sin embargo, la IL-22 es una proteína muy diferente en términos de tamaño, secuencia y propiedades biológicas. Por lo tanto, era contraproducente para los inventores que los ácidos grasos pudieran unirse de forma covalente a la IL-22 mientras se mantiene el efecto terapéutico. Fue particularmente sorprendente que una modificación tan mínima de la IL-22 pudiera dar como resultado una alta potencia (cercana a la hIL-22) combinada con una semivida circulatoria muy prolongada.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un derivado de IL-22 que comprende un ácido graso unido de forma covalente a una proteína IL-22. El ácido graso se puede unir de forma covalente a la proteína IL-22 directamente o a través de un enlazador, que a su vez puede estar formado por varias subunidades. El término "proteína IL-22", tal como se usa la presente, puede significar una proteína IL-22 nativa,

tal como hIL-22, o una variante de esta. Una "variante" puede ser una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos similar a la de la proteína nativa, tal como se define más adelante la presente.

En la naturaleza, la proteína IL-22 humana se sintetiza con un péptido señal de 33 aminoácidos para su secreción. La proteína IL-22 humana madura (es decir, hIL-22) tiene una longitud de 146 aminoácidos y tiene una identidad de secuencia del 80,8 % con la IL-22 murina (esta última tiene una longitud de 147 aminoácidos). La secuencia de aminoácidos de hIL-22 se identifica en la presente como la SEQ ID NO. 1. Al igual que otros miembros de la familia IL-10, la estructura de la IL-22 contiene seis hélices α (denominadas hélices A F).

Los derivados de la invención pueden tener así la secuencia de aminoácidos nativa de hIL-22. De manera alternativa, pueden tener una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos dentro de la secuencia nativa. Pueden incluir de manera adicional o alternativa una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos con respecto a (es decir, fuera de) la secuencia nativa. Por lo tanto, en una modalidad, el derivado comprende un ácido graso unido de forma covalente a hIL-22 o una variante de este.

Expresiones tales como "dentro de", "relativo/respecto a", "correspondiente a" y "equivalente a" se utilizan en la presente para caracterizar el sitio de cambio y/o unión covalente de un ácido graso en una proteína IL-22 con referencia a la secuencia de la proteína nativa, por ejemplo, hIL-22. En la SEQ ID NO. 1, al primer residuo de aminoácido de hIL-22 (alanina (Ala)) se le asigna la posición 1.

Por lo tanto, una variación dentro de la secuencia de hIL-22 es una variación de cualquiera de los residuos números 1-146 en la SEQ ID NO. 1. Por ejemplo, una sustitución de Glu por la Asp nativa en el residuo 10 en hIL-22 se representa en la presente como "D10E". Si el derivado también tiene un ácido graso unido de forma covalente en la posición 10, en la presente se denomina unión en el residuo "10E".

Sin embargo, una variación relativa a la secuencia de hIL-22 es una variación externa a los residuos números 1-146 en la SEQ ID NO. 1. Por ejemplo, el Derivado 2 tal como se define en la presente incluye un péptido de extremo N de 15 aminoácidos

de longitud. Los residuos en el péptido de extremo N se numeran negativamente, comenzando desde el residuo unido al residuo 1 en hIL-22, es decir, el primer residuo en el péptido de extremo N que está unido al residuo 1 en hIL-22 se denomina "-1". Por lo tanto, como el Derivado 2 tiene un ácido graso unido de forma covalente en el 7º residuo en el péptido de extremo N que comienza en la posición -1 y este es Cys, el sitio de unión covalente para el Derivado 2 se denomina en la presente "-7C". Naturalmente, sin embargo, la numeración utilizada en el listado de secuencias para el Derivado 2 comienza desde 1, de conformidad con la Norma ST.25 de la OMPI; como tal, la posición 1 en el listado de secuencias para el Derivado 2 es en realidad el residuo -7 como se menciona en la presente.

Se pueden realizar dos, tres, cuatro, cinco o más variaciones dentro de la secuencia nativa para formar los derivados de la invención. Por ejemplo, se pueden realizar más de 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 o incluso más de 125 variaciones al respecto. Se puede variar cualquiera de los residuos 1-146 en la secuencia nativa. Residuos de ejemplo para la variación son los residuos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 82, 83, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 137, 138, 139, 141, 143, 144, 145 y/o 146 en hIL-22. La variación en los residuos 1, 21, 35, 64, 113 y/o 114 es particularmente ventajosa.

Las variaciones dentro de la secuencia nativa son típicamente sustituciones de aminoácidos. El término "sustitución", tal como se usa en la presente, puede significar el reemplazo de un aminoácido en la proteína nativa por otro. Pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas. Sustituciones de ejemplo son A1C, A1G, A1H, P2C, P2H, I3C, I3H, I3V, S4H, S4N, S5H, S5T, H6C, H6R, C7G, R8G, R8K, L9S, D10E, D10S, K11C, K11G, K11V, S12C, N13C, N13G, F14S, Q15C, Q15E, Q16V, P17L, Y18F, I19Q, T20V, N21C, N21D, N21Q, R22S, F24H, M25E, M25L, L26S, A27L, E29P, A30Q, L32C, L32R, A33C, A33N, D34F, N35C, N35D, N35H, N35Q, N36Q, T37C, T37I,

D38L, V39Q, R40W, L41Q, I42P, E44R, K45A, F47T, H48G, H48R, G49N, V50S, S51C, M52A, M52C, M52L, M52V, S53C, S53K, S53Y, E54D, E54F, R55Q, R55V, C56Q, L58K, M59I, Q61E, V62D, L63C, N64C, N64D, N64Q, N64W, F65G, L67Q, E69D, E69L, V70S, L71C, F72D, F72L, P73C, P73L, Q74T, R77I, F78Q, Q79E, M82Y, Q83G, E84R, V86A, F88N, A90P, A90T, R91C, R91K, R91Y, L92R, S93Y, N94C, N94Q, R95K, R95Q, L96E, S97K, T98C, T98N, T98S, C99V, H100S, E102S, G103D, D104Y, D105Y, L106E, L106Q, H107L, H107N, I108L, Q109Y, R110C, R110K, N111K, V112E, Q113C, Q113R, K114C, K114R, L115V, K116Y, D117E, T118G, V119A, K120H, K121R, L122A, G123V, G126Y, E127C, I128V, K129V, G132Y, E133Q, L134P, D135M, L137D, F138R, M139L, M139R, L141Q, N143S, A144E, C145E, I146R y/o I146V. De manera ventajosa, la sustitución se puede seleccionar del grupo que consiste en A1C, A1G, A1H, N21C, N21D, N21Q, N35C, N35D, N35H, N35Q, N64C, N64D, N64Q, N64W, Q113C, Q113R, K114C y K114R. De manera sorprendente, las sustituciones que se emplean en la invención no afectan negativamente a la actividad de IL-22.

Las combinaciones particulares de sustituciones incluyen (i) A1G, N21D, N35D y N64D; (ii) A1G, I3V, S4N, S5T, H6R, R8K, D10E, K11V, T20V, H48R, M52A, S53K, E54D, R55Q, E69D, F72L, A90T, R91K, R95Q, T98S, E102S, L106Q, H107N, R110K, Q113R, K114R, D117E y I146V; (iii) A1G, I3V, S4N, S5T, H6R, R8K, D10E, K11V, T20V, H48R, M52A, S53K, E54D, R55Q, E69D, F72L, A90T, R91K, R95Q, T98S, E102S, L106Q, H107N, R110K, Q113R, K114R, D117E y I146V; (iv) A1G, N35Q y N64Q; (v) A1G y N64C; (vi) A1G y Q113C; (vii) A1G y K114C; (viii) A1G y M25L; (ix) A1G y M52L; (x) A1G y M139L; (xi) A1G y N36Q; (xii) A1G y D117E; (xiii) A1G y N21Q; (xiv) A1G y N35Q; (xv) A1G y N64Q; (xvi) A1G, N21Q y N35Q; (xvii) A1G, N21Q y N64Q; (xviii) A1G, N21Q, N35Q y N64Q; (xix) A1G y K11C; (xx) A1G y N13C; (xxi) N35Q y N64Q; (xxii) A1C, N35Q y N64Q; (xxiii) H6C, N35Q y N64Q; (xxiv) I3C, N35Q y N64Q; (xxv) P2C, N35Q y N64Q; (xxvi) L32C, N35Q y N64Q; (xxvii) N35Q, M52C y N64Q; (xxviii) N13C, N35Q y N64Q; (xxix) N21C, N35Q y N64Q; (xxx) N35Q, N64Q y N94C; (xxxi) N35Q, N64Q y P73C; (xxxii) N35Q, N64Q y Q113C; (xxxiii) N35Q, N64Q y R91C; (xxxiv) N35Q, N64Q y R110C; (xxxv) S12C, N35Q y N64Q; (xxxvi) N35Q, S51C

y N64Q; (xxxvii) N35Q, S53C y N64Q; (xxxviii) N35Q, T37C y N64Q; (xxxix) N35Q, N64Q y T98C; (xxxx) Q15C, N35Q y N64Q; (xxxxi) N35C y N64Q; (xxxxii) H6C, N35Q y N64Q; (xxxxiii) A33C, N35Q y N64Q; y (xxxxiv) A1H, P2H, I3H, S4H, S5H, C7G, R8G, L9S, D10S, K11G, N13G, F14S, Q15E, Q16V, P17L, 18F, Y19Q, N21Q, R22S, F24H, 5 M25E, L26S, A27L, E29P, A30Q, L32R, A33N, D34F, N35H, T37I, D38L, V39Q, R40W, L41Q, I42P, E44R, K45A, F47T, H48G, G49N, V50S, M52V, S53Y, E54F, R55V, C56Q, L58K, M59I, Q61E, V62D, L63C, N64W, F65G, L67Q, E69L, V70S, L71C, F72D, P73L, Q74T, R77I, F78Q, Q79E, M82Y, Q83G, E84R, V86A, F88N, A90P, R91Y, L92R, S93Y, N94Q, R95K, L96E, S97K, T98N, C99V, H100S, G103D, D104Y, D105Y, L106E, 10 H107L, I108L, Q109Y, R111K, V112E, L115V, K116Y, D117E, T118G, V119A, K120H, K121R, L122A, G123V, G126Y, E127C, I128V, K129V, G132Y, E133Q, L134P, D135M, L137D, F138R, M139R, L141Q, N143S, A144E, C145E e I146R. Cualquiera y todas las combinaciones de sustituciones se contemplan y forman parte de la invención.

Un derivado del primer aspecto puede comprender típicamente una sustitución 15 de aminoácido mediante la cual Cys se sustituye por un residuo nativo, opcionalmente en cualquiera de las posiciones identificadas anteriormente, tal como la posición 1, 2, 3, 6, 11, 12, 13, 15, 21, 32, 33, 35, 37, 51, 52, 53, 63, 64, 71, 73, 91, 94, 98, 110, 113, 114 y/o 127. De forma ventajosa, la proteína IL-22 incluida en un derivado del primer aspecto comprende un residuo Cys en la posición 1 de hIL-22. Una sustitución de A1C 20 combinada con sustituciones en dos sitios de glicosilación en las posiciones 35 y 64 es particularmente ventajosa, ya que conduce a una captación más rápida sin afectar negativamente la potencia o semivida (ver los Derivados 6 y 10 en los Ejemplos 1 y 2).

De manera alternativa o adicional, las variaciones dentro de la secuencia nativa pueden ser inserciones de aminoácidos. Se pueden insertar hasta cinco, 10, 15, 20, 25, 25 30, 35, 40, 45 o incluso hasta 50 aminoácidos dentro de la secuencia nativa. Los trímeros, pentámeros, septámeros, octámeros, nonámeros y 44-meros son particularmente ventajosos a este respecto. Las secuencias ejemplares se muestran en la Tabla 1. Las inserciones se pueden realizar en cualquier lugar de la secuencia nativa, excepto que se prefieren en la hélice A (por ejemplo, en el residuo 30), bucle CD (por

ejemplo, en el residuo 75), hélice D (por ejemplo, en el residuo 85) y/o la hélice F (por ejemplo, en el residuo 124).

n-mero	Ejemplo de secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Trímero	E-T-S	n/a
Pentámero	R-V-Q-F-Q o C-V-E-I-P	2, 3
septámero	G-S-G-S-G-S-C	4
Octámero	I-E-A-L-T-P-H-S o Y-G-Q-R-Q-W-K-N	5, 6
Nonámero	V-F-I-I-N-N-S-L-E	7
44-mero	R-A-A-S-A-G-S-Y-S-E-W-S-M-T-P-R-F-T-P-W-W-E-T-K-I-D-P-P-V-M-N-I-T-Q-V-N-G-S-L-L-V-I-L-H	8

Tabla 1: Secuencia de inserciones de aminoácidos de ejemplo

Las variaciones de secuencia relativas a la secuencia de aminoácidos de hIL-22, si está presente, normalmente incluyen una extensión, tal como la adición de un péptido en el extremo del extremo N. El péptido puede consistir en hasta cinco, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o incluso hasta 50 aminoácidos. Los monómeros, trímeros, octámeros, 13-meros, 15-meros, 16-meros, 21-meros, 28-meros son particularmente ventajosos en este sentido. Las secuencias de ejemplo se muestran en la Tabla 2. De manera conveniente, la proteína IL-22 incluida en un derivado del primer aspecto comprende un G-P-G de extremo N. En un ejemplo particularmente preferido, el derivado del primer aspecto comprende tanto un residuo Cys en la posición 1 de hIL-22 (SEQ ID NO. 1) como un G-P-G de extremo N. Se ha descubierto que esto crea un derivado con una semivida y una potencia muy buenas (ver los Derivados 1, 3 y 5 en los Ejemplos 1 y 2).

n-mero	Ejemplo de secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO.
Monómero	C, G o M	n/a
Trímero	G-P-G	n/a
Octámero	G-P-A-C-E-P-E-E	9
13-mero	G-G-S-S-G-S-G-S-E-V-L-F-Q	10

15-mero	G-P-G-S-G-S-G-S-C-G-S-G-S-G-S	11
16-mero	G-G-S-S-G-S-G-S-E-V-L-F-Q-G-P-G	12
21-mero	G-G-S-S-G-S-G-S-E-V-L-F-Q-G-P-A-C-E-P-E-E	13
28-mero	G-G-S-S-G-S-G-S-E-V-L-F-Q-G-P-G-S-G-S-G-S-C-G-S-G-S-G-S	14

Tabla 2: Secuencia de péptidos de extremo N de ejemplo

Las variaciones de secuencia relativas a la secuencia de aminoácidos de hIL-22, si está presente, pueden incluir la adición de un péptido en el extremo del extremo C. El péptido puede consistir en hasta cinco, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o incluso hasta 50 aminoácidos. Un septámero es particularmente ventajoso en este sentido, que

opcionalmente tiene la secuencia de aminoácidos G-S-G-S-G-S-C (SEQ ID NO. 15). Los derivados de la invención pueden incluir un péptido tanto de extremo N como de extremo C además de la secuencia de aminoácidos de hIL-22 nativa o variante tal como se describe la presente. Cualquier combinación de los péptidos de extremo N y C

descritos en la presente se contempla y se incluye expresamente en la invención. Se apreciará que la invención se extiende a cualquier derivado de IL-22, que comprende un ácido graso unido de forma covalente a hIL-22 o una variante de este. La "variante" puede ser una proteína que tenga al menos un 10 % de identidad de secuencia con hIL-22. En una modalidad, la variante tiene al menos un 20 %, o incluso al menos un 30 %, de identidad de secuencia con hIL-22. La variante puede tener "sustancialmente la secuencia de aminoácidos" de hIL-22, lo que puede significar una secuencia que tiene al menos un 40 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de hIL-22. Por consiguiente, en una modalidad, un derivado del primer aspecto tiene al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de amino identidad de secuencia de ácido con hIL-22. Las variantes de la proteína IL-22 de ejemplo, que se incorporan en los derivados particulares de la invención descritos en la sección experimental, se exponen en las SEQ ID NO. 16-21.

El técnico experto apreciará cómo calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos. Primero se debe preparar una alineación de las dos

secuencias, seguida del cálculo del valor de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad para dos secuencias puede tomar diferentes valores dependiendo de: (i) el método utilizado para alinear las secuencias, por ejemplo, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (implementado en diferentes programas), o alineación estructural a partir de la comparación 3D; y (ii) los parámetros utilizados por el método de alineación, por ejemplo, alineación local *versus* global, la matriz de puntaje de pares utilizada (por ejemplo, BLOSUM62, PAM250, Gonnet, etc.) y la penalización por espacio, por ejemplo, forma funcional y constantes.

Una vez realizada la alineación, hay muchas formas diferentes de calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, se puede dividir el número de identidades entre: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud de la alineación; (iii) la longitud media de la secuencia; (iv) el número de puestos sin espacio; o (v) el número de posiciones equivalentes excluyendo los excedentes. Además, se apreciará que el porcentaje de identidad también depende fuertemente de la longitud. Por lo tanto, cuanto más corto sea un par de secuencias, mayor será la identidad de secuencia que se puede esperar que ocurra por casualidad.

Por tanto, se apreciará que el alineamiento preciso de las secuencias de aminoácidos es un proceso complejo. El popular programa de alineación múltiple ClustalW [48,49] es una forma preferida para generar múltiples alineaciones de proteínas de acuerdo con la invención. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser los siguientes: Para alineaciones de proteínas: penalización por apertura de espacio = 10,0, penalización por extensión de espacio = 0,2 y matriz = Gonnet. Para alineaciones de ADN y proteínas: ENDGAP = -1 y GAPDIST = 4. Los expertos en la técnica sabrán que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para una alineación de secuencia óptima.

Preferentemente, el cálculo del porcentaje de identidades entre dos secuencias de aminoácidos puede calcularse a partir de una alineación como $(N/T) \times 100$, donde N es el número de posiciones en las que las secuencias comparten un residuo idéntico y T es el número total de posiciones comparadas incluyendo los espacios pero excluyendo los excedentes. Por lo tanto, el método más preferido para calcular el

porcentaje de identidad entre dos secuencias comprende (i) preparar un alineamiento de secuencias usando el programa ClustalW usando un conjunto adecuado de parámetros, por ejemplo, como se establece anteriormente; y (ii) insertar los valores de N y T en la siguiente fórmula: Identidad de secuencia = $(N/T) \times 100$.

- 5 Los expertos en la técnica conocerán métodos alternativos para identificar secuencias similares.

De manera conveniente, un derivado del primer aspecto comprende 200 aminoácidos o menos. Por ejemplo, el derivado comprende menos de 190, menos de 180, menos de 170, menos de 160 o incluso menos de 150 aminoácidos. De manera
10 conveniente, el derivado comprenderá al menos 146 aminoácidos, sin embargo, este será el número de aminoácidos en hIL-22. Puede comprender al menos 150 aminoácidos, al menos 160 aminoácidos, al menos 170 aminoácidos o incluso al menos 180 aminoácidos. Los derivados de la invención pueden comprender proteínas de cualquier longitud dentro de los rangos anteriores, pero normalmente tendrán una
15 longitud de 146-180 aminoácidos.

Los derivados de la invención, ya sea que tengan la secuencia de aminoácidos nativa o variante, incluyen un ácido graso unido de forma covalente a la proteína IL-22. El ácido graso está unido típicamente de forma covalente a la proteína IL-22 por un enlazador. El ácido graso y el enlazador se conectan adecuadamente entre sí a través
20 de un enlace amida, y el enlazador se une de forma covalente a la proteína IL-22. Por lo tanto, el ácido graso y el enlazador pueden estar presentes como una cadena lateral en la proteína IL-22. Fue sorprendente para los inventores que un ácido graso unido de forma covalente no afecte negativamente a la actividad de IL-22. Fue particularmente sorprendente que la unión de ácidos grasos se asocie con ventajas adicionales, como
25 la prolongación de la semivida.

El ácido graso puede ser cualquier ácido graso adecuado. En particular, el ácido graso puede ser de la Fórmula I:



donde x es un número entero en el intervalo de 10-18, opcionalmente 12-18, 14-
30 16 o 16-18, y * designa un punto de unión a la proteína IL-22 o enlazador. Puede ser un

diácido graso, tal como un diácido C12, C14, C16, C18 o C20. De forma ventajosa, el ácido graso es un diácido C16 o C18, y más ventajosamente es un diácido C18.

Por ejemplo, $-(CH_2)_x-$ en la Fórmula I puede ser un alquileo lineal en el que x es 10. Este ácido graso puede denominarse convenientemente como diácido C12, es decir, un ácido dicarboxílico graso con 12 átomos de carbono. De manera alternativa, $-(CH_2)_x-$ en la Fórmula I puede ser un alquileo lineal en el que x es 12. Este ácido graso puede denominarse convenientemente como diácido C14, es decir, un ácido dicarboxílico graso con 14 átomos de carbono. De manera similar, $-(CH_2)_x-$ en la Fórmula I puede ser un alquileo lineal en el que x es 14 (diácido C16), 16 (diácido C18) o 18 (diácido C20). Adecuadamente, un derivado del primer aspecto incluye un diácido C14, C16, C18 o C20; más adecuadamente, un diácido C16 o C18, e incluso más adecuadamente un diácido C18.

El diácido puede ser capaz de formar asociaciones no covalentes con la albúmina, promoviendo así la circulación del derivado en el torrente sanguíneo. Los diácidos más cortos (por ejemplo, diácido C16) tienen menor afinidad por la albúmina y, por lo tanto, una semivida más corta que los diácidos más largos (por ejemplo, diácido C18). Sin embargo, siguen siendo derivados de acción prolongada con una semivida esperada en el hombre de más de un día.

La unión de ácidos grasos, por sí misma, también estabilizará la proteína IL-22 frente a la degradación proteolítica. La semivida resultante es típicamente similar a la de las fusiones IL-22-Fc (es decir, muy mejorada en comparación con hIL-22).

Los derivados del primer aspecto pueden comprender combinaciones particulares de un ácido graso y proteína IL-22. Por ejemplo, se puede unir un diácido C14, C16, C18 o C20 a una proteína IL-22 que comprende un residuo Cys en la posición 1 de hIL-22 y/o un G-P-G de extremo N. En un ejemplo, un derivado del primer aspecto comprende un diácido C18 y la proteína IL-22 comprende ambos un residuo Cys en la posición 1 de hIL-22 y un G-P-G de extremo N.

Como antes, el ácido graso se conecta adecuadamente a un enlazador, que se une a la proteína IL-22. El enlazador puede comprender varios elementos enlazadores, que incluyen uno o más aminoácidos tales como uno o más residuos Glu y/o Lys. El

enlazador puede incluir una unidad de oxietilenglicina o unidades de oxietilenglicina de múltiples enlaces, opcionalmente 2-5 de tales unidades, de manera ventajosa, 2 unidades. Uno o más residuos OEG, C₂DA y/o grupos Ac pueden incluirse de manera alternativa o adicional. El enlazador puede comprender una unidad reactiva con Cys.

- 5 Una "unidad reactiva de Cys", tal como se usa en la presente, puede significar una unidad funcional que es capaz de reaccionar con el átomo de azufre de un Cys para crear un enlace covalente de carbono-azufre. La unidad reactiva Cys puede tener cualquiera de varias formas, pero incluye adecuadamente un átomo de carbono unido a un grupo saliente, cuyo grupo saliente es desplazado por el átomo de azufre del Cys
- 10 durante la formación del enlace carbono-azufre. El grupo saliente puede ser un halógeno, opcionalmente un átomo de bromo. Este grupo saliente de bromuro puede ser alfa para un grupo funcional acetamida; ventajosamente es un grupo funcional de bromo-acetamida. El grupo saliente puede ser alternativamente un grupo hidroxilo funcionalizado en forma de mesilato o tosilato, o un grupo hidroxilo no funcionalizado.
- 15 Además, el grupo saliente puede ser una maleimida u otro grupo funcional. Los enlazadores de ejemplo incluyen γ Glu-OEG-OEG-C₂DA-Ac, γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu-OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac y γ Glu-OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac, pero se puede emplear cualquier enlazador adecuado.

- 20 El ácido graso, o enlazador, puede unirse a cualquier residuo de aminoácido en la proteína IL-22. Ejemplos a este respecto son los residuos -7, -5, 1, 6, 33, 113, 114 y 153 en o respecto a la secuencia de aminoácidos de hIL-22. El residuo nativo normalmente se sustituye con Cys o Lys para permitir la unión del ácido graso o enlazador. De manera alternativa, el ácido graso o el enlazador se pueden unir a un residuo Cys o Lys nativo. Adecuadamente, el ácido graso o enlazador se une a un
- 25 residuo Cys sustituido en la posición 1, 6, 33, 113 o 114 de hIL-22 o a un residuo Cys en la posición -5, -7 o 153 con respecto a hIL-22. En particular, el ácido graso o enlazador puede estar unido a un residuo Cys sustituido en la posición 1 de hIL-22.

- La unión del ácido graso o enlazador a la proteína IL-22 es una unión covalente. Por ejemplo, se puede usar un ácido graso reactivo con Cys o enlazador para unir el
- 30 ácido graso o enlazador a un residuo Cys en la proteína IL-22. El ácido graso o

5 enlazador puede unirse de forma covalente al átomo de azufre del residuo de Cys a través de un enlace tioéter. De manera alternativa, se puede usar un ácido graso reactivo con Lys o enlazador para unir el ácido graso o enlazador a un residuo Cys en la proteína IL-22. El ácido graso o enlazador puede unirse alternativamente de forma covalente al grupo de amina libre (-NH₂) en el extremo N de la proteína IL-22 (independientemente del aminoácido en la posición 1). La unión puede proceder como con la unión de Cys, aunque con cantidades subestequiométricas de ácido graso o enlazador que contiene una especie N-reactiva adecuada. El ácido graso o enlazador puede presentarse en forma de un aldehído (la especie N-reactiva) y unirse de forma covalente a la amina libre empleando una aminación reductora clásicamente conocida.

10 Un derivado del primer aspecto por lo tanto comprende de forma adecuada un diácido C14, C16, C18 o C20 unido por un enlazador a una variante de hIL-22, donde la variante comprende un G-P-G de extremo N y un residuo Cys en la posición 1 de hIL-22 y el enlazador está opcionalmente unido al residuo Cys.

15 Los derivados de ejemplo del primer aspecto comprenden una proteína IL-22 como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO. 16-21. Derivados particularmente ventajosos se muestran en la Tabla 3, ilustrados en las Figuras 1-4 y ejemplificados en la presente.

ID	Variaciones de secuencia	SEQ ID NO.	Sitio de unión covalente	Enlazador	Ácido o graso
Derivado 1	Sustitución A1C y péptido de extremo N G-P-G	16	1C	γGlu-OEG-OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C18
Derivado 2	Péptido de extremo N G-P-G-S-G-S-G-S-C-G-S-G-S-G-S	17	-7C	γGlu-OEG-OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C18
Derivado 3	Sustitución A1C y péptido de extremo N G-P-G	16	1C	γGlu-OEG-OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C16

Derivado 4	Péptido de extremo N G-P-G-S-G-S-G-S-C- G-S-G-S-G-S	17	-7C	γ Glu-OEG- OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C16
Derivado 5	Sustitución A1C y péptido de extremo N G-P-G	16	1C	γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu- OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac	Diácido C14
Derivado 6	Sustituciones A1C, N35Q, N64Q y péptido de extremo N G-P-G	18	1C	γ Glu-OEG- OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C18
Derivado 7	Sustituciones A1C, N35Q, N64Q	19	1C	γ Glu-OEG- OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C18
Derivado 8	Sustituciones H6C, N35Q, N64Q y péptido de extremo N G	20	6C	γ Glu-OEG- OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C18
Derivado 9	Sustituciones A33C, N35Q, N64Q	21	33C	γ Glu-OEG- OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C18
Derivado 10	Sustituciones A1C, N35Q, N64Q y péptido de extremo N G-P-G	18	1C	γ Glu-OEG- OEG-C ₂ DA-Ac	Diácido C16

Tabla 3: Derivados de ejemplo de II-22

La Figura 1A ilustra un diácido C18 conectado a un enlazador que comprende una unidad reactiva con Cys. Este es el ácido graso y enlazador (cadena lateral) usado en los Derivados 1, 2 y 6-9. La Figura 1B ilustra un diácido C16 conectado a un enlazador que comprende una unidad reactiva con Cys. Este es el ácido graso y enlazador (cadena lateral) usado en los Derivados 3, 4 y 10. La Figura 1C ilustra un diácido C14 conectado a un enlazador que comprende una unidad reactiva con Cys. Este es el ácido graso y enlazador (cadena lateral) usado en el Derivado 5.

Los derivados 1, 6 y 10 se ilustran en las Figuras 2-4, respectivamente.

Los derivados de la invención pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas y la invención se refiere a todas ellas.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un proceso
5 para preparar un derivado del primer aspecto que comprende unir de forma covalente un ácido graso a una proteína IL-22.

El proceso se puede usar para producir cualquiera de los diferentes derivados de IL-22 descritos o previstos en la presente, pero es particularmente ventajoso cuando un ácido graso se une de forma covalente a una proteína variante de IL-22. Por lo tanto, en
10 una modalidad, la proteína IL-22 empleada en el segundo aspecto es una forma sustituida de hIL-22, opcionalmente sustituida en la posición 1, 21, 35, 64, 113 y/o 114. Sustituciones de ejemplo incluyen A1C, A1G, A1H, N21C, N21D, N21Q, N35C, N35D, N35H, N35Q, N64C, N64D, N64Q, N64W, Q113C, Q113R, K114C y/o K114R. Preferentemente, la proteína IL-22 se sustituye con un residuo Cys en la posición 1.

15 El ácido graso se puede obtener por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye los medios recombinantes. Los ácidos grasos adecuados se encuentran disponibles comercialmente o derivan fácilmente de materiales de partida disponibles utilizando síntesis química estándar.

La proteína IL-22 se puede obtener por cualquier medio conocido en la técnica,
20 que incluye los medios recombinantes. La producción de hIL-22 recombinante se ha descrito previamente y es bien conocida en la técnica. Las proteínas IL-22 variantes deseadas se pueden producir de manera similar. Un investigador experimentado en el campo podría identificar fácilmente las secuencias de ácido nucleico adecuadas que codifican las proteínas variantes de IL-22 deseadas. Por lo tanto, el experto en la
25 técnica podría ejecutar fácilmente esta parte de la invención, basándose en el conocimiento existente en la técnica. De manera conveniente, las proteínas IL-22 se producen en sistemas de mamíferos, tal como en células de ovario de hámster chino (CHO), usando técnicas estándar. Se puede emplear una etiqueta de polihistidina (etiqueta His) para ayudar a la purificación por afinidad de las proteínas recombinantes.

En este sentido, las proteínas IL-22 tal como se usan en la invención se pueden preparar usando una etiqueta His escindible después de la expresión, una adición de extremo N o C de menos de 10, preferentemente seis, residuos de histidina que se pueden purificar por afinidad con una columna de níquel. La etiqueta His está unida al extremo N o C de la proteína a través de un enlazador que puede ser digerido por una proteasa conocida para dejar la proteína IL-22 libre. La etiqueta His escindible puede tener la secuencia de aminoácidos, HHHHHHGGSSGSGSEVLFQ (SEQ ID NO. 25), y el enlazador escindible por proteasa puede ser un enlazador del virus del grabado del tabaco (TEV), cuya secuencia de consenso para los sitios de corte nativos es ENLYFQ\S (SEQ ID NO. 26), donde '\ ' indica el enlace de péptido escindido o un enlazador escindible de proteasa de rinovirus-14 3C (HRV14-3C) humano con sitio de escisión consenso EVLFQ. La escisión se puede lograr al incubar aproximadamente 10 µg de proteasa con 2,5 µg de proteína y 2-mercaptoetanol 10 mM a temperatura ambiente durante 4 horas.

Para ilustrar más la invención, se proporciona a continuación un proceso representativo para la preparación de proteínas. El proceso involucra la preparación de un plásmido de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos deseada de la proteína IL-22. Este plásmido se puede transfectar transitoriamente en una línea celular, por ejemplo, CHO-K1, que se deja crecer en un medio relevante antes de que aumente el crecimiento mediante la adición de un potenciador conocido. Luego la proteína IL-22 secretada se puede recolectar mediante métodos conocidos de centrifugación y filtración estéril antes de purificar la proteína en una columna de níquel. Después de la concentración y el intercambio de amortiguador, la etiqueta His se elimina usando una proteasa HRV14-3C antes de la alquilación con un ácido graso (descrito más adelante) y la purificación final y el intercambio de amortiguador. Se puede utilizar el análisis del producto final mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS) con o sin desglucosilación para garantizar la calidad del producto final.

El ácido graso se puede unir de forma covalente a la proteína IL-22 directamente o usando un enlazador como se describe en el primer aspecto. El enlazador se puede

obtener por cualquier medio conocido en la técnica. Un método representativo para preparar el ácido graso y el enlazador, si se emplea, es el siguiente (ejemplificado por el diácido C16 usado en el Derivado 10, pero cualquier derivado podría prepararse usando un método similar).

5 Se agrega una solución de N-(benciloxicarboniloxi)succinimida (100 g, 401 mmol) en diclorometano (500 ml) a una solución de etilendiamina (189 ml, 2,81 mol) en diclorometano (750 ml). Después de 30 minutos, la suspensión se filtra, se lava y se concentra al vacío. El residuo se diluye con tolueno (750 ml), se lava y se extrae con diclorometano (4 x 200 ml), se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, se
10 concentra al vacío y se diluye con hexanos (200 ml). Se agrega a la solución una solución 4 M de cloruro de hidrógeno en éter (100 ml, 400 mmol), la suspensión resultante se concentra al vacío y se diluye con hexanos (1 l). El sólido precipitado se filtra, se lava con hexanos y se seca al vacío para proporcionar clorhidrato de éster bencílico del ácido (2-aminoetil)carbámico en forma de un polvo blanco.

15 La resina de 2-clorotritilo 100-200 se carga con ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-Ado-OH, 17,5 g, 45,4 mmol). El grupo Fmoc se elimina y se obtiene una solución de tetrafluoroborato de 0-6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 24,2 g, 68,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (21,4 ml, 123 mmol) en N,N dimetilformamida (140 ml) se agrega a
20 la resina y la mezcla se agita durante una hora. La resina se filtra y se lava. El grupo Fmoc se elimina por tratamiento con piperidina al 20 % como antes. La resina se lava como antes.

 Una solución de éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-(fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico (Fmoc-Glu-OtBu, 29,0 g, 68,1 mmol), TCTU (24,2
25 g, 68,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (21,4 ml, 123 mmol) en N,N dimetilformamida (140 ml) se agrega a la resina y la mezcla se agita durante una hora. La resina se filtra y se lava como antes. El grupo Fmoc se elimina por tratamiento con piperidina al 20 % como antes. La resina se lava como antes.

 Una solución de ácido 16-terc-butoxi)-16-oxohexadecanoico (23,3 g, 68,1 mmol),
30 TCTU (24,2 g, 68,1 mmol) y N,N diisopropiletilamina (21,4 ml, 123 mmol) en mezcla de

N,N-dimetilformamida/diclorometano (4:1, 200 ml) se agrega a la resina. La resina se agita durante una hora, se filtra y se lava con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml), metanol (2 x 250 ml) y diclorometano (6 x 250 ml). El producto se escinde de la resina por tratamiento con 2,2,2-trifluoroetanol (250 ml) durante 18 horas. La resina se filtra y se lava con diclorometano (2 x 250 ml), mezcla de 2-propanol/diclorometano (1:1, 2 x 250 ml), 2-propanol (250 ml) y diclorometano (3 x 250 ml).

Las soluciones se combinan, el disolvente se evapora y el producto bruto se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida. El ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-41,41-dimetil-10,19,24,39-tetraoxo-3,6,12,15,40-pentaoxa-9,18,23-triazadotetracontanoico puro es se secó al vacío y se obtuvo como un aceite amarillo espeso de color amarillo pálido.

Posteriormente se agrega hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 11,4 g, 30,1 mmol) y trietilamina (8,77 ml, 62,9 mmol) a una solución de ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-41,41-dimetil-10,19,24,39-tetraoxo-3,6,12,15,40-pentaoxa-9,18,23-triazadotetracontanoico (22,4 g, 27,4 mmol) en diclorometano seco (110 ml). Se agrega trietilamina (72 ml, 41,0 mmol) a una suspensión de clorhidrato de éster bencílico del ácido (2-amino-etil)-carbámico (6,94 g, 30,1 mmol) en diclorometano seco (165 ml) y la mezcla resultante se agrega a la solución anterior. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche y luego se evapora hasta sequedad. El residuo se vuelve a disolver y se lava; se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó por cromatografía en columna (gel de sílice 60, 0,040-0,060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5) para proporcionar éster terc-butílico del ácido 15-[(S)3-(2-{2-[(2-{2- [(2-benciloxycarbonilamino-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]etil-carbamoil)metoxi]etoxi)-etilcarbamoil)-1-terc-butoxicarbonilpropilcarbamoil]-pentadecanoico como un aceite espeso de color amarillo pálido.

Se agrega paladio sobre carbono (10 %, 1,27 g, 1,20 mmol) a una solución del compuesto anterior (23,8 g, 24,0 mmol) en metanol (350 ml) y la mezcla resultante se hidrogena a presión normal durante cuatro horas. El catalizador se filtra y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se evapora varias veces en diclorometano para

eliminar los residuos de metanol y se seca al vacío para producir terc-butil(S)-1-amino-25-terc-butoxicarbonil)-4,13,22,27-tetraoxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12,21,26-tetraazadotetracontan-42-oato como un aceite espeso e incoloro.

Se agrega N,N-diisopropiletilamina (4,98 ml, 28,6 mmol) a una solución de la amina anterior (20,5 g, 23,8 mmol) en diclorometano seco (290 ml) a -30 °C en argón. Se agrega gota a gota bromuro de bromoacetilo (2,48 ml, 28,6 mmol) y la solución resultante se agita a -30 °C durante tres horas más. Se retira el baño de enfriamiento, se agita la mezcla a temperatura ambiente durante una hora y se elimina el disolvente al vacío. El residuo se vuelve a disolver en acetato de etilo (450 ml) y se lava con una solución acuosa al 5 % de ácido cítrico (300 ml). Las fases se separan en una hora. La capa orgánica se deja separar durante la noche para dar tres fases. La capa acuosa transparente se elimina y las dos fases residuales se agitan con una solución acuosa saturada de bromuro de potasio (100 ml). Las fases se dejan para que se separen durante la noche, se elimina la fase acuosa y se seca la fase orgánica en sulfato de sodio anhidro. El disolvente se elimina al vacío y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida: diclorometano/metanol 95:5) para proporcionar terc-butil(S)-1-bromo-28-terc-butoxicarbonil)-2,7,16,25,30-pentaoxo-9,12,18,21-tetraoxa-3,6,15,24,29-pentaazapenta-tetracontan-45-oato como un sólido incoloro.

El compuesto anterior (19,5 g, 19,8 mmol) se disuelve en ácido trifluoroacético (120 ml) y la solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El ácido trifluoroacético se elimina al vacío y el residuo se evapora en diclorometano (6 x 200 ml). Se agrega éter dietílico (200 ml) al residuo oleoso y la mezcla se agita durante la noche para proporcionar una suspensión. El producto sólido se filtra, se lava con éter dietílico y hexanos y se seca al vacío para proporcionar el producto deseado ácido 15-{{(S)-1-carboxi3-[2-(2-{{2-(2-{{2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi}-etoxietil-carbamoil]metoxi}etoxil-etilcarbamoil]propilcarbamoil]pentadecanoico como un polvo blanco.

La unión covalente del ácido graso o enlazador a la proteína IL-22 puede llevarse a cabo usando procedimientos estándar en la técnica. El enlazador, si se emplea, permite la unión covalente de la proteína IL-22 al ácido graso. A modo de ejemplo no

taxativo, un ácido graso reactivo con Cys o enlazador puede reaccionar con el átomo de azufre de un residuo de Cys en la proteína IL-22, formando así un enlace tioéter. Las condiciones adecuadas para la etapa de unión covalente se pueden ejemplificar de la siguiente manera: Se agrega Tris en agua a la proteína IL-22 (70 mg) en amortiguador

5 de Tris y NaCl (1,35 mg/ml), para ajustar a pH 8. Se agrega sal dipotásica de dihidrato de bis(p-sulfonatofenil)-fenilfosfina (BSPP) (12 mg), disuelta en agua, y se agita suavemente durante cuatro horas a temperatura ambiente. Se agrega ácido 15-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)-

10 etilcarbamoil]etoxi)etoxi)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]propil-carbamoil]pentadecanoico (19 mg, 0,022 mmol) en etanol (0,5 ml) y la mezcla se agita suavemente durante la noche. Se agrega agua MiliQ (150 ml) para reducir la conductividad a 2,5 mS/cm. Luego la mezcla se purifica mediante intercambio aniónico en una columna MonoQ 10/100 GL utilizando amortiguador de unión (Tris 20 mM, pH 8,0), amortiguador de elución (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0), flujo de 6 ml y un

15 gradiente de amortiguador de elución al 0-80 % en 60 volúmenes de columna.

Los derivados de la invención pueden purificarse utilizando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, tal como cromatografía, electroforesis, solubilidad diferencial o extracción.

Tal como se describe en la presente, los inventores se sorprendieron al

20 encontrar que los ácidos grasos podían unirse de forma covalente a una proteína IL-22 mientras mantienen la actividad biológica. Fue particularmente sorprendente que una modificación tan mínima de la IL-22 pudiera dar como resultado una alta potencia (cercana a la hIL-22) combinada con una semivida circulatoria muy prolongada. Esta combinación particular de propiedades puede ser muy deseable.

25 La potencia de los derivados puede determinarse en un ensayo in vitro con células completas que expresan receptores de IL-22 humanos. Por ejemplo, la respuesta de los receptores humanos de IL-22 puede medirse utilizando células de riñón de hámster bebé (BHK) que sobreexpresan IL-22R1, IL-10R2 y un gen indicador que responde a fosfo-STAT3 (pSTAT3). De manera alternativa, pueden usarse células

30 HepG2 que expresan de forma endógena el receptor de IL-22. La activación de los

receptores conduce a la activación de la vía de señalización de STAT3, que se puede medir usando un gen indicador de luciferasa con un promotor inducido por STAT3 o al analizar pSTAT3, por ejemplo. Los ejemplos no taxativos de tales ensayos se describen en el Ejemplo 2. La potencia *in vivo* puede determinarse en modelos animales o en ensayos clínicos, como se sabe en la técnica.

El valor de la concentración efectiva máxima media (EC_{50}) se usa a menudo como una medida de la potencia de un fármaco. Como esto representa la concentración de fármaco necesaria para producir el 50 % del efecto máximo, cuanto menor sea el valor de EC_{50} , mejor será la potencia. Los derivados de la invención tienen adecuadamente una potencia (valor EC_{50}) medida usando la activación de STAT3 mediada por el receptor de IL-22 en células por debajo de 1,5 nM, por debajo de 1,25 nM, por debajo de 1 nM, por debajo de 0,75 nM, por debajo de 0,5 nM, por debajo de 0,25 nM o incluso por debajo de 0,1 nM (por ejemplo, determinado como se describe en el Ejemplo 2). Los derivados de la invención tienen adecuadamente una potencia (valor EC_{50}) que se mide al someter a ensayo pSTAT3 en células por debajo de 15 nM, por debajo de 12 nM, por debajo de 10 nM, por debajo de 7 nM o incluso por debajo de 5 nM (por ejemplo, determinado como se describe en el Ejemplo 2).

De forma ventajosa, la potencia de los derivados de IL-22 puede ser superior a la de las fusiones IL-22-Fc. Por ejemplo, Genentech ha informado una reducción de 34 veces en la potencia *in vitro* de su fusión IL-22-Fc, UTTR1147A, en comparación con hIL-22 (Stefanich *et ál.*, *Biochem Pharmacol*, 2018, 152:224-235). Por el contrario, se ha demostrado que la unión covalente de un ácido graso a hIL-22 provoca una reducción de la potencia de solo siete veces (ver el Derivado 1 en los Ejemplos). Si bien tanto las fusiones IL-22-Fc como los derivados de la presente invención pueden ser comparables en términos de su semivida mejorada sobre hIL-22 y función biológica en al menos algunos entornos, los derivados de la invención pueden tener la ventaja adicional de mínima pérdida de potencia.

La semivida de eliminación circulatoria ($T_{1/2}$) de los derivados puede determinarse *in vivo* mediante la administración de los derivados por vía subcutánea o intravenosa en un modelo animal adecuado, como un ratón, una rata o un minicerdo.

Los métodos adecuados se describen en el Ejemplo 1. A modo de ejemplo no taxativo, los derivados del primer aspecto tienen una semivida circulatoria después de la administración subcutánea o intravenosa a ratones de al menos una hora, al menos tres horas, al menos cinco horas o incluso al menos ocho horas. Los derivados pueden tener una semivida circulatoria después de la administración subcutánea o intravenosa a ratas de al menos tres horas, al menos cinco horas, al menos ocho horas, al menos 10 horas o incluso al menos 13 horas. Los derivados pueden tener una semivida circulatoria después de la administración subcutánea o intravenosa a minicerdos de al menos 25 horas, al menos 40 horas, al menos 70 horas o incluso al menos 100 horas (todas determinadas, por ejemplo, tal como se describen en el Ejemplo 1).

Tal como se ejemplifica en la presente, los inventores también han descubierto que los derivados de la invención se absorben rápidamente *in vivo*. De forma ventajosa, la absorción de los derivados puede ocurrir más rápido que la de las fusiones IL-22-Fc. El tiempo medio de absorción es un parámetro preciso para medir la captación porque es independiente de la dosis y la concentración de plasma máxima tras la administración del fármaco. Puede calcularse en función del tiempo medio de residencia, es decir, el tiempo que pasa un fármaco en el organismo antes de su eliminación una vez que se ha completado la absorción. Los derivados de la invención tienen adecuadamente un tiempo medio de absorción por debajo de 100 h, por debajo de 90 h, por debajo de 80 h, por debajo de 70 h o incluso por debajo de 60 h (por ejemplo, determinado tal como se describe en el Ejemplo 1).

Los derivados de la invención también tienen buenas propiedades biofísicas, tales como alta estabilidad física y/o solubilidad, que pueden medirse usando métodos estándar en la técnica.

Por lo tanto, de acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un derivado del primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica del tercer aspecto puede comprender cualquiera de los diferentes derivados de IL-22 descritos o previstos en la presente. De manera

conveniente, comprende uno de los derivados de IL-22 identificados en la presente como Derivado 1-10.

Un derivado del primer aspecto, o una composición farmacéutica del tercer aspecto, demostrará adecuadamente una semivida de eliminación circulatoria
5 aumentada en comparación con hIL-22. De forma ventajosa, demostrará una semivida de eliminación circulatoria aumentada en comparación con hIL-22 en al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 100 % o más.

Las composiciones farmacéuticas del tercer aspecto pueden prepararse al combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado del primer aspecto con
10 un vehículo farmacéuticamente aceptable. La formulación de ingredientes farmacéuticamente activos con diversos excipientes es conocida en la técnica.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un derivado del primer aspecto es cualquier cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es la cantidad de derivado que se necesita para tratar la enfermedad, trastorno o afección o producir el efecto
15 deseado.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del derivado utilizado puede ser de alrededor de 0,001 mg a alrededor de 1000 mg, y preferentemente de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 500 mg. Se prefiere que la cantidad del derivado sea una cantidad de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 100 mg y, más preferentemente, de
20 alrededor de 0,5 mg a alrededor de 50 mg. Como guía, la dosis de derivado utilizada en los ratones en el Ejemplo 3 descrito en la presente fue de 0,5 mg/kg (administrada por vía subcutánea).

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como se hace referencia la presente, es cualquier compuesto conocido o combinación de compuestos conocidos
25 que los expertos en la técnica saben que son útiles para formular composiciones farmacéuticas.

En una modalidad, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido; opcionalmente la composición puede estar en forma de polvo para resuspensión. Un vehículo sólido farmacéuticamente aceptable puede incluir una o más sustancias que
30 también pueden actuar como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes

de suspensión, colorantes, rellenos, deslizantes, aglutinantes inertes, conservantes o colorantes. El vehículo también puede ser un material encapsulante. En polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está mezclado con los derivados finamente divididos de acuerdo con la invención. Los polvos contienen preferentemente hasta un
5 99 % de derivado. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa y resinas de intercambio iónico.

En otra modalidad, el vehículo farmacéutico puede ser un gel y la composición puede estar en forma de una crema o similar.

10 Sin embargo, el vehículo farmacéutico puede ser un líquido; opcionalmente la composición farmacéutica puede estar en forma de una solución. Se utilizan vehículos líquidos en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. Un derivado de acuerdo con la invención se puede
15 disolver o suspender en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, tal como agua, un solvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, amortiguadores, conservantes, edulcorantes, agentes saborizantes, agentes de suspensión, agentes
20 espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizadores u osmorreguladores. Los ejemplos adecuados de vehículos líquidos para la administración parenteral incluyen agua (que contiene parcialmente aditivos descritos anteriormente, por ejemplo, derivados de celulosa, preferentemente una solución de carboximetilcelulosa de sodio), alcoholes (que incluyen alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ejemplo, glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo,
25 aceite de coco fraccionado y aceite de arachis). Para la administración parenteral, el vehículo también puede ser un éster oleoso, tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones en forma de líquido estéril para administración parenteral. El vehículo líquido para las composiciones
30 presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro apuntalante farmacéuticamente aceptable.

El proceso para preparar una composición farmacéutica de la invención puede comprender, por lo tanto, las etapas habituales que son estándar en la técnica.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, por lo tanto, se proporciona un derivado del primer aspecto o una composición farmacéutica del tercer aspecto, para
5 usar en terapia. También se proporciona un método para tratar a un sujeto con un derivado de la invención, o una composición farmacéutica que lo comprende. Cualquiera de los diferentes derivados de IL-22 descritos o previstos en la presente se incluyen expresamente en estos aspectos de la invención.

Los términos tales como "tratamiento" y "terapia", tal como se utilizan en la
10 presente, incluyen expresamente el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad, trastorno o afección.

El derivado de IL-22 o la composición farmacéutica que lo comprende puede administrarse directamente a un sujeto a tratar. El derivado o composición farmacéutica se puede administrar por cualquier medio, que incluye por inhalación, por inyección, por
15 vía tópica u ocular. Cuando se administra por inhalación, puede ser por la nariz o por la boca. Preferentemente, el derivado o la composición farmacéutica se administran por inyección, normalmente por vía subcutánea o intravenosa. Por lo tanto, los derivados tienen una clara ventaja sobre las fusiones Fc en su flexibilidad de administración (por ejemplo, por inyección, por inhalación, aplicación tópica o administración ocular) debido
20 a su menor tamaño y mayor potencia. Se apreciará que la administración, a un sujeto a tratar, de un derivado de la invención dará como resultado un mayor tiempo de circulación en comparación con hIL-22, y que esto ayudará en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Tal como se mencionó anteriormente, "tratar" también incluye mejorar y prevenir una enfermedad, trastorno o afección.

25 Las composiciones farmacéuticas líquidas, que son soluciones o suspensiones estériles, se pueden utilizar, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal y particularmente subcutánea o intravenosa. El derivado se puede preparar como una composición sólida estéril que puede disolverse o suspenderse al momento de la administración mediante el uso de agua estéril, solución
30 salina u otro medio inyectable estéril adecuado.

Las formas útiles para la inhalación incluyen soluciones, emulsiones y suspensiones estériles. De manera alternativa, los derivados se pueden administrar en forma de polvo fino o aerosol a través de Dischaler® o Turbohaler®. Las inhalaciones nasales pueden estar adecuadamente en forma de un polvo fino o aerosol nasal en aerosol o Dischaler® o Turbohaler® modificado.

Las formulaciones tópicas incluyen soluciones, cremas, espumas, geles, lociones, ungüentos, pastas, tinturas y polvos. Pueden ser epicutáneos, es decir, aplicados directamente sobre la piel, o aplicados sobre las membranas mucosas.

Las formulaciones para administración ocular son típicamente soluciones, suspensiones y ungüentos para aplicación tópica, por ejemplo, en forma de gotas para los ojos. De manera alternativa, se pueden utilizar soluciones o suspensiones estériles mediante inyección intraocular. El derivado se puede preparar como una composición sólida estéril que puede disolverse o suspenderse al momento de la administración mediante el uso de agua estéril, solución salina u otro medio inyectable estéril adecuado. La formulación puede ser para inyección subconjuntival, intravítrea, retrobulbar o intracameral.

Un derivado o composición farmacéutica de la invención se puede administrar a cualquier sujeto que lo necesite. Un "sujeto", tal como se usa en la presente, puede ser un vertebrado, un mamífero o un animal doméstico. Por lo tanto, los derivados y las composiciones de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar a cualquier mamífero, por ejemplo, ganado (por ejemplo, un caballo), mascotas, o se pueden usar en otras aplicaciones veterinarias. Más preferentemente, el sujeto es un ser humano. Los derivados y composiciones no solo necesitan administrarse a aquellos que ya muestran signos de una enfermedad, trastorno o afección. Más bien, se pueden administrar a sujetos aparentemente sanos como medida puramente preventiva contra la posibilidad de tal enfermedad, trastorno o afección en el futuro.

Se apreciará que los derivados de IL-22 y las composiciones de acuerdo con la invención se pueden usar en una monoterapia (es decir, el único uso de ese derivado o composición), para tratar una enfermedad, trastorno o afección. De manera alternativa, los derivados y las composiciones de acuerdo con la invención se pueden usar como

complemento o en combinación con terapias conocidas para tratar una enfermedad, trastorno o afección.

Se apreciará que la cantidad del derivado de IL-22 que se requiere está determinada por su actividad biológica, semivida y biodisponibilidad, que a su vez depende del modo de administración, las propiedades fisicoquímicas del derivado y la composición, y ya sea que se esté utilizando como monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también estará influenciada por la semivida del derivado dentro del sujeto que se está tratando. Los expertos en la técnica pueden determinar las dosificaciones óptimas para administrar y variarán con el derivado particular utilizado, la potencia de la composición farmacéutica, el modo de administración y la evolución de la enfermedad, trastorno o afección. Factores adicionales que dependan del sujeto tratado darán como resultado la necesidad de ajustar las dosificaciones, que incluyen la edad, peso, género, dieta del sujeto y momento de la administración.

En general, se puede utilizar una dosis diaria de entre 0,001 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal del derivado de IL-22 de acuerdo con la invención para tratar una enfermedad, trastorno o afección, dependiendo del derivado o la composición que se usa. Más preferentemente, la dosis diaria está entre 0,01 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal y 1 mg/kg de peso corporal, más preferentemente entre 0,1 $\mu\text{g/kg}$ y 500 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, y lo más preferentemente entre aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/kg}$ y 100 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal.

El derivado de IL-22 o la composición se pueden administrar antes, durante o después del inicio de la enfermedad, trastorno o afección. Las dosis diarias se pueden administrar como una sola administración (por ejemplo, una sola inyección diaria). De manera alternativa, el derivado o composición puede requerir la administración dos o más veces durante un día. A modo de ejemplo, los derivados se pueden administrar como dos (o más dependiendo de la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección que se esté tratando) dosis diarias de entre 0,07 μg y 700 mg (es decir, suponiendo un peso corporal de 70 kg). Un paciente que recibe tratamiento puede tomar una primera dosis al despertar y luego una segunda dosis por la noche (si está en un régimen de

dos dosis) o a intervalos de 3 o 4 horas a partir de entonces. Las dosis pueden administrarse alternativamente una vez a la semana, cada quince días o una vez al mes, o más frecuentemente, por ejemplo, dos o tres veces por semana. Se pueden utilizar procedimientos conocidos, tales como los empleados convencionalmente por la industria farmacéutica (por ejemplo, experimentación *in vivo*, ensayos clínicos, etc.), para formar formulaciones específicas de los derivados y composiciones de acuerdo con la invención y regímenes terapéuticos precisos (tales como las dosis diarias de los agentes y la frecuencia de administración).

Muchos estudios han demostrado los efectos clave de la IL-22 en múltiples modelos de lesión epitelial, especialmente en pulmón, hígado, intestino, riñón, piel, páncreas y timo. Mecánicamente, varias vías dentro de, por ejemplo, la antiapoptosis, proliferación, inmunidad innata, estrés antioxidativo, antifibrosis y reclutamiento de células madre/células progenitoras han sido bien documentadas para mediar los efectos de la IL-22 en estudios realizados por múltiples investigadores. Hallazgos mecanísticos clave se han confirmado aún más *in vitro* utilizando líneas celulares humanas o en modelos humanos *ex vivo* (por ejemplo, organoides intestinales humanos primarios). Por lo tanto, está bien establecido el fuerte papel de la IL-22 para prevenir la muerte celular, asegurar la regeneración y controlar la inflamación en la lesión epitelial.

Muchos estudios se realizan mediante el análisis de modelos genéticos (inactivación de IL-22 o sobreexpresión transgénica) sometidos a lesión. En estos estudios, la falta de IL-22 o la sobreexpresión de IL-22 estarán presentes en el momento de la lesión. En otros estudios, la IL-22 se neutraliza con anticuerpos en el momento de la lesión y, en algunos casos, la IL-22 se neutraliza más allá de la fase de lesión aguda (por ejemplo, de forma subaguda o bien entrada en una fase de regeneración). Otros estudios se acercan más a un escenario de tratamiento al observar los efectos de la IL-22 administrada exógenamente. Es importante tener en cuenta que, cuando se observa de manera holística la bibliografía disponible, los diferentes modelos, ya sea inactivación, sobreexpresión, neutralización de IL-22 antes o después de la lesión o dosificación de proteína exógena, muestran la misma imagen de

IL-22 que protege los órganos lesionados y llevan a la regeneración. Esto indica una amplia aplicación y una amplia ventana de tiempo para el potencial de tratamiento con IL-22, y también muestra por qué se requiere una proteína IL-22 de acción más prolongada que hIL-22.

5 Por lo tanto, de acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona un derivado del primer aspecto o una composición farmacéutica del tercer aspecto, para usar en un método para tratar una enfermedad, trastorno o afección metabólica, hepática, pulmonar, intestinal, renal o cutánea. Cualquiera de los diferentes derivados de IL-22 descritos o previstos en la presente se incluyen expresamente en este aspecto
10 de la invención.

La enfermedad, trastorno o afección metabólica puede ser obesidad, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hiperglucemia o hiperinsulinemia.

La enfermedad, trastorno o afección hepática puede ser NAFLD, NASH, cirrosis, hepatitis alcohólica, insuficiencia hepática aguda, insuficiencia hepática crónica, ACLF,
15 toxicidad hepática inducida por acetaminofeno, lesión hepática aguda, colangitis esclerosante, cirrosis biliar o una condición patológica causada por cirugía o trasplante.

La enfermedad, trastorno o afección pulmonar puede ser EPOC, fibrosis quística, bronquiectasias, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de dificultad respiratoria aguda, una lesión química, una infección vírica, una infección bacteriana o una infección
20 fúngica.

La enfermedad, trastorno o afección intestinal puede ser IBD, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, GvHD, una lesión química, una infección viral o una infección bacteriana.

La enfermedad, trastorno o afección renal puede ser una enfermedad renal
25 aguda o una enfermedad renal crónica.

La enfermedad, trastorno o afección de la piel puede ser una herida, enfermedad inflamatoria o GvHD.

También se proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una afección que responde al tratamiento con IL-22, tal como una o más de las

enfermedades, trastornos o condiciones anteriores, con un derivado de IL-22, o una composición farmacéutica que la comprende.

El derivado de IL-22 tiene todas las características especificadas para el primer aspecto de la invención. La composición farmacéutica tiene todas las características especificadas para el tercer aspecto de la invención. El método para tratar a un sujeto que tiene una afección que responde al tratamiento con IL-22, tal como una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones anteriores, tiene todas las características especificadas para el cuarto aspecto de la invención.

No hay restricción sobre qué derivado de IL-22 o composición tal como se describe la presente debe administrarse a qué paciente. Más bien, se pretende que cualquiera de los derivados y composiciones descritos en la presente se pueda administrar a cualquier paciente tal como se describe en la presente.

Todas las características descritas en la presente (incluidas las reivindicaciones, el resumen y las figuras adjuntas), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso descrito de este modo, pueden combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones donde al menos algunas de tales características y/o etapas son mutuamente excluyentes.

Para una mejor comprensión de la invención, y para mostrar cómo se pueden llevar a cabo las modalidades de esta, ahora se hará referencia a los Ejemplos, que no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Los materiales y métodos empleados en los estudios descritos en los Ejemplos fueron los siguientes, a menos que se indique lo contrario.

Derivados

La Tabla 4 proporciona una descripción general de los derivados de IL-22 y los comparadores representados en los conjuntos de datos.

Los derivados de IL-22 tenían varias estructuras, tipos de ácidos grasos y sitios de unión covalente y, por lo tanto, eran representativos de la diversidad de derivados abarcados por la invención. El enlazador utilizado en todos los casos fue γ Glu-OEG-OEG-C₂DA-Ac. En todos los casos, el enlazador se unió al residuo 1C, excepto en los

Derivados 2 (-7C), 4 (-7C), 8 (6C) y 9 (33C). Mientras que el Derivado 7 ejemplifica la unión covalente en 1C, carece del péptido G-P-G de extremo N presente en todos los demás derivados que tienen un ácido graso unido de forma covalente en 1C.

- 5 Los comparadores fueron hIL-22, hFc-hIL-22 (una proteína de fusión recombinante) y variantes de hIL-22 (es decir, hIL-22 que tiene solo una o más variaciones de la estructura principal).

ID	SEQ ID NO. (para la proteína IL-22)	Variación de la estructura principal	Ácido graso u otro transportador
hIL-22	SEQ ID NO. 1	Ninguno	Ninguno
hFc-hIL-22	SEQ ID NO. 1	Ninguno	Fc
Comparador 1	SEQ ID NO. 22	A1G	Ninguno
Comparador 2	SEQ ID NO. 23	A1G, N21D, N35D, N64D	Ninguno
Comparador 3	SEQ ID NO. 24	A1G, N35Q, N64Q	Ninguno
Comparador 4	SEQ ID NO. 16	Péptido de extremo N G-P-G, A1C	Ninguno
Comparador 5	SEQ ID NO. 18	Péptido de extremo N G-P-G, A1C, N35Q, N64Q	Ninguno
Derivado 1	SEQ ID NO. 16	Péptido de extremo N G-P-G, A1C	Diácido C18
Derivado 2	SEQ ID NO. 17	Péptido de extremo N G-P-G-S-G-S-G-S-C-G-S-G-S-G-S	Diácido C18
Derivado 3	SEQ ID NO. 16	Péptido de extremo N G-P-G, A1C	Diácido C16
Derivado 4	SEQ ID NO. 17	Péptido de extremo N G-	Diácido C16

		P-G-S-G-S-G-S-C-G-S-G-S-G-S	
Derivado 6	SEQ ID NO. 18	Péptido de extremo N G-P-G, A1C, N35Q, N64Q	Diácido C18
Derivado 7	SEQ ID NO. 19	A1C, N35Q, N64Q	Diácido C18
Derivado 8	SEQ ID NO. 20	Péptido de extremo N G, H6C, N35Q, N64Q	Diácido C18
Derivado 9	SEQ ID NO. 21	A33C, N35Q, N64Q	Diácido C18
Derivado 10	SEQ ID NO. 18	Péptido de extremo N G-P-G, A1C, N35Q, N64Q	Diácido C16

Tabla 4: Descripción general de los derivados y comparadores clave representados en los conjuntos de datos

Se llevó a cabo un análisis de control de calidad de los derivados producidos para los ejemplos como se indica a continuación.

- 5 La masa intacta de proteínas se determinó en una muestra posdesglicosilada al agregar 20 µl de una muestra de 1 mg/ml a 2 µl de N-glucosidasa F a temperatura ambiente durante 48 h. Luego las muestras se diluyeron a 0,2 mg/ml con PBS a pH 7,4 y se analizaron utilizando un Synapt G2 conectado a Waters Synapt G2, con Waters MassLynx 4.1. Se utilizó una columna Acquity UPLC Protein BEH C4 de 10-90 1,7 µm
- 10 1x100 mm con las siguientes fases móviles: A: ácido fórmico al 0,1 % en agua; y B: acetonitrilo, ácido fórmico al 0,09 %. El flujo fue de 120 µl/min, UV 214 nm (20 pts/s) y el gradiente fue como se muestra en la Tabla 5.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% de A
Inicial	0,12	90
1	0,12	90
17	0,12	10
18	0,12	0
19	0,12	0
20	0,12	90

25	0,12	90
----	------	----

Tabla 5: Gradiente (% y min) empleado para control de calidad de derivados de IL-22

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

ID	Masa teórica desglicosilada (Da)	Masa desglicosilada observada (Da)	Tiempo de retención (min)
Derivado 1	17807,6	17807,0	13,81
Derivado 3	17779,6	17778,5	11,68
Derivado 4	18658,4	18657,5	7,11
Derivado 5	18225,0	18224,0	7,28
Derivado 6	17832,7	17832,0	7,40

Tabla 6: Masa y tiempo de retención observados para derivados clave de IL-22

- 5 Los datos de control de calidad verificaron así que los derivados previstos efectivamente se habían producido.

Los siguientes son protocolos de ejemplo, destinados simplemente a ilustrar la invención reivindicada. El número exacto de animales y los cursos de tiempo empleados en los estudios pueden variar, como sabrá un experto en la técnica.

10 **Ejemplo 1 – Estudio farmacocinético**

Métodos

Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos en derivados seleccionados en ratones (n=27), ratas (n=4-8) y minicerdos (n=2-5). Los derivados de IL-22 se probaron junto con variantes de hIL-22, hFc-hIL-22 y/o hIL-22 como comparadores.

- 15 (i) Ratones y ratas

Se obtuvieron 30 ratones macho C57Bl/6 de 8 semanas de edad y cinco ratas macho Sprague Dawley de Taconic Biosciences. Los ratones se alojaron en grupos de 10. Los animales fueron aclimatados durante una semana antes de los experimentos. El peso corporal se midió antes de la dosificación, lo cual es importante para los cálculos farmacocinéticos. Los animales estuvieron despiertos durante todo el experimento, con acceso a comida y agua.

Todos los derivados y comparadores se prepararon como soluciones de 0,3 mg/ml en PBS, pH 7,4, para usar en ratones y soluciones de 0,5 mg/ml para usar en ratas. Se probó una dosis de 2,0 mg/kg en ratones. Se probó una dosis de 1 mg/kg en ratas.

Los derivados y comparadores se administraron a los animales por vía subcutánea. Se tomaron muestras de sangre en puntos de tiempo específicos después de la dosificación.

Se utilizó muestreo disperso en ratones; por lo tanto, se administró a 27 ratones un derivado de IL-22 o un comparador y se tomaron muestras de sangre de tres ratones diferentes en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, 120 min, 150 min, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h, 24 h, 32 h y 48 h. Por lo tanto, a cada ratón se le tomaron solo dos muestras durante el transcurso del estudio. Después de que se tomó la última muestra, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

Se administró a cinco ratas un derivado de IL-22 o un comparador y se tomaron tres muestras de sangre en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, 120 min, 150 min, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h. A cada rata se le tomaron 17 muestras durante el transcurso del estudio. Después de que se tomó la última muestra, las ratas fueron sacrificadas con dióxido de carbono.

Se tomaron muestras de sangre (100 µl) de ratones y ratas mediante sangre de la lengua y se transfirieron a tubos EDTA (Microvette® VetMed 200 K3E, Sarstedt nr 09.1293.100). La sangre se centrifugó durante cinco minutos a 8000 G, 4 °C dentro de los 20 minutos posteriores a la extracción. Las muestras de plasma (40-50 µl) se transfirieron a medios tubos semimicrónicos.

(ii) Minicerdos

Se obtuvieron minicerdos Göttingen hembra de 9 meses de edad con un peso corporal de aproximadamente 15 kg de Ellegaard Göttingen Minipigs A/S. Se permitió un período de aclimatación de aproximadamente 18 días antes de la cirugía (inserción de catéteres), tiempo durante el cual los minicerdos socializaron y fueron entrenados para la dosificación subcutánea y la toma de muestras de sangre del catéter. De tres a cinco días antes de la cirugía, los minicerdos se alojaron en una sola casa. Seis días antes de la dosificación, todos los minicerdos tenían insertados dos catéteres venosos centrales (Cook Medical, C-TPNS-6.5-90-REDO, silicona, tamaño 6,5 french, tipo TPN de 106 cm de largo), lo que permitió un tiempo de recuperación después de la cirugía de al menos cinco días antes del inicio del estudio (dosificación).

Todos los derivados y comparadores se prepararon como soluciones en PBS, pH 7,4. Las dosis utilizadas fueron 0,1 mg/kg (administrada por vía intravenosa) o 0,2 mg/kg (administrada por vía subcutánea).

Los minicerdos se anestesiaron ligeramente con propofol durante la dosificación. Se administraron inyecciones intravenosas a minicerdos a través del catéter central largo. Después de la administración, el catéter se enjuagó con 10 ml de solución salina estéril. La inyección subcutánea se administró a una profundidad de 5 mm utilizando una aguja de 25 G. La aguja se mantuvo en la piel durante 10 s después de la inyección para evitar el reflujo.

Se tomaron muestras de sangre de los minicerdos en los siguientes puntos de tiempo después de la administración intravenosa: 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h, 28 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h, 240 h, 264 h, 312 h, 336 h, 360 h, 384 h, 408 h, 432 h y 480 h. Se tomaron muestras de sangre en los siguientes puntos de tiempo después de la dosificación subcutánea: 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h, 24 h, 26 h, 28 h, 46 h, 52 h, 72 h, 96 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h, 240 h, 264 h, 312 h, 336 h, 360 h, 384 h, 408 h, 432 h y 480 h.

Se recogieron muestras de sangre (1 ml) de minicerdos en tubos con EDTA (tubo de 1,3 ml que contenía K3EDTA para producir 1,6 mg de K3EDTA/ml de sangre (Sarstedt, Alemania)). Las muestras se mantuvieron en hielo húmedo durante un

máximo de 30 min hasta la centrifugación (10 min, 4 °C, 2000 G). Se transfirieron 200 µl de plasma a tubos Micronic para la medición de los derivados de IL-22 o comparadores y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis.

(iii) *Procesamiento de muestras*

5 Los niveles de plasma de derivados de IL-22 o comparadores se midieron usando ensayos de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI®) desarrollados internamente como se describió anteriormente (Poulsen *et ál. J Biomol Screen*, 2007, 12(2):240-7). Durante los ensayos, se creó un complejo inmunitario de perla-analito dependiente de la concentración, lo que dio como resultado una salida de luz, que se
10 midió en un lector Perkin Elmer Envision. El acoplamiento de anticuerpos a perlas, la biotinilación de anticuerpos y el procedimiento de ensayo LOCI se realizaron tal como se describió anteriormente (Petersen *et ál., J Pharmaceut Biomed*, 2010, 51(1):217-24). Los calibradores y las muestras de control de calidad (QC) se produjeron en la misma matriz que las muestras del estudio. Se evaluó la precisión del ensayo (% CV) y se
15 demostró que era inferior al 20 % para todas las muestras analizadas.

El ensayo utilizó perlas aceptoras conjugadas con anticuerpo monoclonal IL-22 antihumano (R&D Systems MAB7822) junto con anticuerpo monoclonal biotinilado (R&D Systems BAM7821; producido contra IL-22 humana) y perlas donantes genéricas recubiertas con estreptavidina. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para la IL-22
20 humana en plasma de rata fue 4 pM. Sin embargo, cada derivado o comparador se midió frente a una fila de calibradores del mismo derivado. Se midió la reactividad cruzada de cada derivado o comparador contra hIL-22 y se usó para ajustar la sensibilidad del ensayo.

Los perfiles de concentración de plasma-tiempo se midieron para minicerdos
25 utilizando un análisis no compartimental (NCA) en Phoenix WinNonlin Professional 6.4 (Pharsight Inc). Los cálculos se realizaron usando concentraciones individuales, ponderando por $1/(Y*Y)$, y usando logarítmica lineal trapezoidal. Se utilizó la dosificación intravenosa porque la semivida de eliminación circulatoria ($T_{1/2}$) era el parámetro principal de detección. El aclaramiento y el volumen de distribución fueron

parámetros secundarios de interés, por lo tanto, el motivo de las muestras de sangre frecuentes durante el día 1 del estudio.

El único parámetro medido para evaluar la farmacocinética en ratones y ratas fue la semivida de eliminación circulatoria ($T_{1/2}$). En los minicerdos, los parámetros adicionales medidos fueron la concentración de plasma máxima (pico) después de la administración del fármaco ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo para alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$), el área bajo la curva de concentración del fármaco en plasma -tiempo (AUC, por su sigla en inglés; que refleja la exposición corporal al fármaco después de la administración de una dosis del fármaco) normalizado para la dosis del fármaco (AUC/D, por su sigla en inglés), tiempo medio de residencia (MRT, por su sigla en inglés; es decir, el tiempo que el fármaco pasa en el cuerpo antes de la eliminación una vez que se ha completado la absorción), tiempo de absorción media (MAT, por su sigla en inglés) y disponibilidad sistémica de la dosis administrada (es decir, biodisponibilidad; F). MAT se calcula como MRT luego de la administración subcutánea (MRT_{sc}) menos MRT luego de la administración intravenosa (MRT_{IV}).

Resultados

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos en ratones, la Tabla 8 muestra los resultados obtenidos en ratas y las Tablas 9 y 10 muestran los resultados obtenidos en los minicerdos. ND = No determinado. IV = administración intravenosa. SC = administración subcutánea.

ID	Vía de administración	$T_{1/2}$ (h)
hFC-hIL-22	IV	ND
	SC	30,0
Comparador 1	IV	0,4
	SC	1,4
Comparador 3	IV	0,4
	SC	0,7
Derivado 1	IV	6,0
	SC	8,3
Derivado 6	IV	6,6

	SC	9,1
--	----	-----

Tabla 7: Datos farmacocinéticos obtenidos en ratones

Tal como se muestra en la Tabla 7, las variantes de hIL-22 que tenían variaciones de la estructura principal solamente (Comparadores 1 y 3) tenían una semivida circulatoria corta, independientemente de la vía de administración. La prolongación con fusión de Fc (hFc-hIL-22) aumentó considerablemente la semivida. La unión covalente de ácido graso (diácido C18; Derivados 1 y 6) resultó en una semivida circulatoria intermedia en ratones. Los derivados de IL-22 circularon durante más tiempo en ratones cuando se administraron por vía subcutánea en comparación con la intravenosa.

ID	Vía de administración	T _{1/2} (h)
Comparador 1	IV	0,2
	SC	ND
Derivado 1	IV	11,1
	SC	10,9
Derivado 3	IV	4,3
	SC	9,7
Derivado 6	IV	10,8
	SC	12,3

Tabla 8: Datos farmacocinéticos obtenidos en ratas

Tal como se muestra en la Tabla 8, la variante de hIL-22 que tenía sola una variación de la estructura principal (Comparador 1) tenía una semivida circulatoria corta. La unión covalente de ácidos grasos (derivados 1, 3 y 6) dio como resultado un aumento de la semivida circulatoria en ratas, independientemente del ácido graso (diácido C16 frente a C18) empleado y la vía de administración. Los derivados de IL-22 circularon típicamente durante más tiempo cuando se administraron por vía subcutánea en comparación con la intravenosa.

ID	Vía de administración.	T _{1/2} (h)
hIL-22	IV	4,6

	SC	6,6
hFc-hIL-22	IV	65,4
	SC	141,0
Comparador 1	IV	3,9
	SC	8,7
Comparador 2	IV	3,5
	SC	3,7
Derivado 1	IV	53,9
	SC	ND
Derivado 6	IV	66,5
	SC	106,0
Derivado 10	IV	ND
	SC	40,0

Tabla 9: Datos farmacocinéticos obtenidos en minicerdos

5 Tal como se muestra en la Tabla 9, las variantes de hIL-22 que tenían variaciones de la estructura principal solamente (Comparadores 1 y 2) tenían una semivida circulatoria corta, en comparación con hIL-22. La fusión Fc del comparador (hFc-hIL-22) y todos los derivados de IL-22 (Derivados 1, 6 y 10) tuvieron una semivida circulante significativamente mayor. Los derivados de IL-22 tenían una semivida circulante de más de 50 horas en los minicerdos cuando se administraban por vía intravenosa, lo que estaba a la par con el comparador de la fusión de IL-22-Fc.

ID	Vía de administración.	C _{máx} (nmol/l)	T _{máx} (h)	AUC/D (h*kg*pmol / l*pmol)	MRT (h)	MA T (h)	F (%)
hFc-hIL-22	IV	56,0	0,05	407	91,7	ND	ND
	SC	14,8	5,00	365	192,0	100	89,7
Derivado 6	IV	98,9	0,05	551	85,6	ND	ND
	SC	37,6	8,00	399	146	60,3	72,4

Tabla 10: Datos farmacocinéticos obtenidos en minicerdos

Tal como se muestra en la Tabla 10, se demostró una MAT más rápida para el derivado de IL-22 (Derivado 6) en comparación con la fusión Fc de comparación (hFc-IL-22). MAT es una medida más precisa de la absorción del fármaco que simplemente comparar $T_{\text{máx}}$, ya que también tiene en cuenta las diferencias en $C_{\text{máx}}$ ($T_{\text{máx}}$ está influenciado tanto por la dosis como por $C_{\text{máx}}$). Se utilizaron minicerdos para este estudio, en lugar de ratones o ratas, debido a su similitud con los humanos.

Conclusión

El conocido derivado de GLP-1 alquilado con ácido graso, semaglutida, tiene una semivida de 46 horas en el minicerdo (Lau *et ál.*, *J Med Chem*, 2015, 58(18):7370-80) y una semivida de 160 horas en el hombre, lo que corresponde a un perfil de dosificación de una vez por semana con una relación de pico a valle de 2. La semivida del derivado de GLP-1 de fusión de Fc, dulaglutida, es similar.

La semivida demostrada por los derivados de IL-22 en el minicerdo, de al menos 40 horas cuando se administran por vía subcutánea y más de 50 horas cuando se administran por vía intravenosa, se supone que corresponde a un perfil de dosificación de una vez por semana en el hombre con una relación de pico a valle de 2.

Por lo tanto, los datos muestran que los derivados de la invención mejoraron las semividas circulantes de IL-22 y demostraron propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas optimizadas, por lo que ofrecen un tratamiento nuevo y mejorado para una amplia gama de indicaciones, que incluye las enfermedades, trastornos y afecciones metabólicas, hepáticas, pulmonares, intestinales, de los riñones, ojos, timo, páncreas y piel.

Ejemplo 2– Estudio de potencia *in vitro*

Métodos

Se emplearon dos ensayos *in vitro* para estudiar la potencia.

El primero fue un ensayo de gen indicador en células BHK, que habían sido triplemente transfectadas con IL-22Ra, IL-10Rb y una luciferasa con el promotor inducido por STAT3. Este es un ensayo altamente sensible y de alto rendimiento, que midió la activación de STAT3 mediada por el receptor de IL-22.

Se generó una línea celular indicadora BHK estable usando los siguientes plásmidos: (i) hIL-10Rb en pcDNA3,1hygro(+), (ii) IL22R en pcDNA3,1(Zeocin) y (iii) 2xKZdel2 en pGL4.20. Por lo tanto, la línea celular expresó el indicador IL-10Rb humano, IL-22Ra humano y luciferasa bajo el control de un promotor impulsado por pSTAT3.

El día 0 del protocolo de ensayo, las células se sembraron en medio basal (para 500 ml: DMEM+Glutamax (Gibco, n.º de cat.: 31966-021), suero fetal bovino al 10 % (p/v) (FCS; contiene albúmina) (50 ml) y 1 % (p/v) de penicilina-estreptomicina (P/S) (5 ml)) a 15 000-20 000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (Corning n.º 3842, negro, fondo transparente). El Día 1, se eliminó el medio invirtiendo la placa. Se agregó medio basal fresco, a razón de 50 µl por pocillo, y las células se incubaron durante 60 minutos.

Los derivados de IL-22 se probaron junto con hIL-22 y variantes de hIL-22 que tenían variaciones de la estructura principal solo como comparadores. El número 'n' de animales utilizados para probar cada derivado o comparador osciló de 1-36.

Por lo tanto, se agregó a cada pocillo 50 µl de un derivado diluido o comparador (diluido en medio basal) y se dejó la placa durante cuatro horas. Por lo tanto, los derivados y los comparadores se diluyeron 2x, ya que se diluyeron en los 50 µl de medio que ya estaba en los pocillos. La estimulación finalizó después de cuatro horas mediante la adición de 100 µl de Steadylite plus reactivo (Perkin Elmer n.º de cat. 6066759). La placa se selló con TopSeal A, se agitó a 450 rpm durante 15 minutos y luego se leyó usando Mithras o un sistema similar a más tardar después de 12 horas.

Se realizó el análisis de datos utilizando GraphPad Prism. La concentración eficaz máxima media (EC₅₀) de cada derivado o comparador se evaluó como una medida de su potencia. EC₅₀ se determinó utilizando Log(compuesto) frente a la variable respuesta - pendiente (4p). La pendiente de la colina se restringió a 1 como estándar.

El segundo ensayo de potencia *in vitro* midió pSTAT3 en células HepG2, una línea celular derivada de hígado humano que expresa endógenamente IL-22Ra e IL-10Rb.

El día 1, las células HepG2 se colocaron en placas a razón de 25 000-30 000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (Biocoat #35-4407 Becton Dickinson). El medio celular utilizado para las placas y los pases fue DMEM(1x) + 25 mM (4,5 g/l) de glucosa, -piruvato (Gibco, n.º de cat. 61965-026) + FCS al 10 % (p/v) + 1 % (p/v) P/S. El día 2, las células estaban listas para el ensayo. Las células se privaron con FCS al 0,1 % (p/v) (es decir, una concentración de albúmina muy baja) en DMEM (Gibco, n.º de cat. 61965-026); se agregaron 50 µl a cada pocillo y se dejaron durante 60 minutos.

Las pruebas se realizaron en siete concentraciones de cada derivado o comparador como estándar (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 nM) utilizando duplicados técnicos. Por lo tanto, se agregó a cada pocillo 50 µl de un derivado diluido o comparador (diluido en FCS al 0,1 % (p/v) en DMEM) y se dejó la placa durante 15 minutos. Por lo tanto, los derivados y los comparadores se diluyeron 2x, ya que se diluyeron en los 50 µl de medio que ya estaba en los pocillos. Para lisar las células, se extrajo el medio de las células y se agregó a cada pocillo 50 µl de amortiguador de lisis 1x recién preparado (amortiguador de lisis SureFire del kit). La placa se agitó a 350 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se siguió el protocolo de ensayo AlphaScreen® SureFire® STAT3 (p-Tyr705) (Perkin Elmer n.º de cat. TGRS3S (500-10K-50K)) para medir la fosforilación inducida por IL-22 de STAT3. A este respecto, se transfirieron 4 µl de lisado a una proxiplaca de 384 pocillos para el ensayo (al agregar 4 µl de control positivo y negativo). Inmediatamente antes del uso, se preparó la mezcla de aceptores (al diluir el amortiguador de activación 5 veces en el amortiguador de reacción y al diluir las perlas de aceptores 50 veces en el amortiguador diluido). Se agregaron 5 µl de la mezcla aceptora a cada pocillo, la placa se selló con una película adhesiva Topseal A y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Inmediatamente antes del uso, se preparó la mezcla donante (diluyendo las perlas donantes 20 veces en amortiguador de dilución). Se agregaron 2 µl de mezcla donante a los pocillos bajo luz tenue. La placa se volvió a sellar con película adhesiva Topseal A y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La placa se leyó en un lector de placas compatible con Alpha Technology.

Se realizó el análisis de datos utilizando GraphPad Prism. En primer lugar, se llevó a cabo una regresión no lineal utilizando el análisis Log(compuesto) en función de la respuesta - pendiente variable (4p) en Prism. La pendiente de la colina se restringió a 1. A continuación, se usó la Y = superior del compuesto de control (ya sea hIL-22 etiquetada con His o hIL-22) para una normalización en Prism. 0 % se estableció en el valor más pequeño de cada conjunto de datos y 100 % en Y = superior de la regresión no lineal anterior (para el control). Se repitió una regresión no lineal como anteriormente y el % de actividad/peso y EC₅₀ de los derivados probados se leyeron en los resultados debajo de superior y EC₅₀ respectivamente.

10 Resultados

La Tabla 11 muestra la EC₅₀ de derivados clave y comparadores medidos en el ensayo del gen indicador de células BHK para la activación de STAT3 mediada por el receptor de IL-22.

ID	EC ₅₀ (nM)
hIL-22	0,07
Comparador 1	0,06
Comparador 5	0,19
Comparador 14	0,09
Derivado 1	0,48
Derivado 3	0,30
Derivado 4	0,18
Derivado 6	0,61
Derivado 7	0,09
Derivado 8	1,24
Derivado 9	0,28
Derivado 10	0,37

Tabla 11: Valores de EC₅₀ para derivados y comparadores clave en el ensayo de

15 células BHK

Como el ensayo de células BHK contenía altas cantidades de albúmina, la EC₅₀ medida incorporó el efecto de la unión de la albúmina al probar los derivados.

Se demostró que el comparador 4, una variante de IL-22 que tiene variaciones de estructura principal solamente, es equipotente con hIL-22. El derivado 3, que tiene la misma estructura principal que el Comparador 4, pero unido de forma covalente a un aglutinante de albúmina de afinidad media (diácido C16), mostró una reducción de cuatro veces en la potencia en comparación con hIL-22. El derivado 1, que tiene otra vez la misma estructura principal, pero unido de forma covalente a un aglutinante de albúmina de afinidad alta (diácido C18), solo mostró una reducción de siete veces en la potencia en comparación con hIL-22.

Se realizó una exploración de las posiciones de alquilación y las variaciones de la estructura principal con compensación en un fondo 35Q, 64Q (es decir, dos de los tres sitios de glicosilación de IL-22 mutados) al comparar los resultados para los Derivados 6-9. Los sitios de unión covalente en estos derivados se eligieron en base a un análisis de la estructura de IL-22 que identifica posiciones que se espera que estén expuestas en la superficie y no involucradas en la unión al receptor. Los resultados obtenidos con estos derivados demuestran que la sustitución de Cys y la unión covalente de ácidos grasos pueden tolerarse en varias posiciones (selectas), lo que resultó sorprendente para los inventores.

La Tabla 12 muestra la EC_{50} de derivados clave y comparadores medidos en el ensayo de células HepG2 para pSTAT3.

ID	EC_{50} (nM)
hIL-22	3,88
Comparador 1	4,73
Comparador 4	12,11
Derivado 1	10,13
Derivado 2	6,98
Derivado 6	14,86

Tabla 12: Valores de EC_{50} para derivados y comparadores clave en el ensayo de células HepG2

En el ensayo de células HepG2 con nivel de expresión endógena de receptores, poca amplificación de señal y sin albúmina, el Derivado 1 tenía una potencia 2,5 veces

reducida en comparación con hIL-22 (similar al Comparador 4, una variante de hIL-22 que tiene la misma estructura que el Derivado 1, pero sin ácido graso).

La Tabla 13 recopila los resultados de los ensayos de células BHK y HepG2 para evaluar la unión covalente de ácidos grasos en la extensión de extremo N y la mutación de los sitios de glicosilación. ND = No determinado.

ID	Células BHK EC ₅₀ (nM)	Células HepG2 EC ₅₀ (nM)
hIL-22	0,07	3,88
Derivado 1	0,48	10,13
Derivado 2	ND	6,98
Derivado 4	0,18	ND
Derivado 6	0,61	14,86

Tabla 13: Valores de EC₅₀ para derivados y hIL-22 clave en los ensayos de células BHK HepG2

El Derivado 6 difiere del Derivado 1 por las sustituciones adicionales N35Q y N64Q (dos de los tres sitios de glicosilación mutados), pero son equipotentes (con una tendencia a una potencia ligeramente menor para el Derivado 6).

Mientras que los Derivados 2 y 4 tienen una extensión de extremo N de 15-mero, con el residuo Cys para la unión de ácidos grasos en la extensión (-7C), se muestra sorprendentemente bien tolerado.

Conclusión

La reducción de potencia observada con la unión covalente de ácidos grasos en los derivados probados de la invención fue impulsada principalmente por la unión de albúmina, con poca contribución de las sustituciones de la estructura principal. Esto quedó demostrado por la sorprendente equipotencia del Comparador 4 y hIL-22. En comparación, y como se mencionó anteriormente, Genentech informa una reducción de 34 veces en la potencia *in vitro* para su fusión Fc de IL-22.

En el ensayo de células HepG2 con niveles muy bajos de albúmina, el Derivado 1 (el derivado de IL-22 que mostró una reducción de potencia de siete veces en el ensayo de BHK (con unión a albúmina)) mostró solo una reducción de potencia de 2,5 veces en comparación con hIL -22.

La equipotencia de los Derivados 1 y 6 (Tabla 13) mostró que las mutaciones 35Q y 64Q se toleran sorprendentemente sin efecto sobre la potencia.

Por lo tanto, los derivados de IL-22 mantienen una alta potencia en presencia de albúmina y son casi equipotentes con hIL-22 en ausencia de albúmina. La sustitución
5 Cys y la unión covalente de ácidos grasos se toleran en varias posiciones.

Por lo tanto, los datos muestran que los derivados de la invención demostraron buena biodisponibilidad y potencia, por lo que ofrecen un tratamiento nuevo y mejorado para una amplia gama de indicaciones, que incluye las enfermedades, trastornos y afecciones metabólicas, hepáticas, pulmonares, intestinales, de los riñones y de la piel.

10 **Ejemplo 3 – Estudio de eficacia *in Vivo* en diabetes**

Este estudio fue diseñado para investigar el efecto de la dosificación una vez al día con un derivado de la invención durante 8-16 días en un modelo de ratón con diabetes. El estudio se realizó en modo de tratamiento (no preventivo), lo que significa que la patología de diabetes se desarrolló antes de que se iniciara la dosificación.
15 Como el modelo de ratón tiene un hígado graso (inactivación del receptor de leptina), también funciona como un modelo metabólico de enfermedad hepática.

Métodos

Se obtuvieron ratones macho C57BKS db/db de 7-8 semanas de edad de Charles River Laboratories (Día -10) y se aclimataron durante al menos una semana
20 antes del comienzo de los experimentos. Una semana después de la llegada (Día -3), los ratones se distribuyeron al azar y se alojaron en grupos de 10 (o individualmente para el estudio de ingesta de alimentos). En el Día -3, y en cada uno de los Días 1-16 del estudio, se midieron la glucosa en sangre y la ingesta de alimentos.

Se probó un derivado de IL-22 (Derivado 1) junto con una fusión Fc de IL-22
25 (hFc-hIL-22) como comparador y vehículo solo como control negativo. Cada agente se administró por vía subcutánea en una dosis una vez al día de 0,1, 0,25, 0,5 o 1,0 mg/kg en cada uno de los días 1-16 en los ratones diabéticos db/db (n=6-10 en cada grupo). La ingesta de alimentos se redujo después de la dosificación del derivado/comparador/control.

La glucosa en sangre se midió diariamente durante la duración del estudio. Se tomaron muestras de sangre de los ojos al final en ratones anestesiados. Se recogieron 500 µl de sangre en tubos con EDTA. Las muestras se mantuvieron en hielo y se centrifugaron durante cinco minutos a 6000 G a 4 °C en 20 minutos. El plasma se separó en tubos micrónicos de 0,75 ml y se congeló inmediatamente para la posterior medición de las concentraciones de los componentes.

Además de medir la concentración del derivado o del comparador, al final del estudio se midieron los niveles de plasma de los biomarcadores de participación objetivo (las proteínas de fase aguda derivadas del hígado, haptoglobina y componente P de amiloide sérico (SAP) y el péptido YY (PYY) derivado del intestino). La haptoglobina se midió en un instrumento COBAS (Roche Diagnostics) con kit comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El PYY se midió con un ensayo ELISA comercial (ALPCO) que reconoce el PYY de ratón y rata de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El SAP se midió con un ensayo ELISA comercial (R&D Systems) que reconoce la Pentraxina 2 / SAP de ratón de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Los niveles de glucosa en sangre durante la duración del estudio se muestran en las Figuras 5 y 6A.

Tal como se puede ver en la Figura 5, hIL-22 y una variante de hIL-22 que solo tienen variaciones de la estructura principal (Comparador 3) no lograron reducir la glucosa en sangre durante el transcurso del estudio en comparación con el control del vehículo.

Tal como se puede ver en la Figura 6A, el Derivado 1 y hFc-hIL-22 redujeron la glucosa en sangre de manera comparable hacia niveles normales con una eficacia ligeramente mayor del Derivado 1 en los últimos días del estudio, a pesar de la mayor participación objetivo de hFc- hIL-22 que refleja un mayor nivel de exposición en estado estacionario en el estudio específico. Se observó una reducción en la ingesta de alimentos en los animales tratados en comparación con el control del vehículo (ver Figura 6B). El derivado probado normalizó así la glucosa en sangre en el modelo db/db

de manera similar a hFc-hIL-22; como en el caso anterior, no se observó tal efecto con hIL-22 o Comparador 3.

El nivel de los biomarcadores de participación objetivo, haptoglobina, SAP y PYY, medidos al final del estudio, se muestran en la Figura 7A-C, respectivamente. Tal como se puede ver en las gráficas, los tres biomarcadores de participación objetivo aumentaron con el derivado probado y hFc-hIL-22, más aún con hFc-hIL-22 que con el Derivado 1.

La Figura 8 muestra los datos de dosis-respuesta para el Derivado 6 (otro derivado de la invención, siendo el mismo que el Derivado 1 pero para sustituciones adicionales en dos sitios de glicosilación). Las tres dosis probadas (0,1, 0,25 y 0,5 m/kg) fueron eficaces para reducir la glucosa en sangre a lo largo del tiempo, y más progresivamente con el aumento de la concentración.

Conclusión

Ambos derivados probados y hFc-hIL-22 normalizaron la glucosa en sangre en el modelo db/db, demostrando así un efecto terapéutico *in vivo*. Es importante destacar que no se observó tal efecto con la dosificación de hIL-22, lo que demuestra que la exposición crónica obtenida con los derivados de acción prolongada y la fusión Fc es necesaria para el efecto terapéutico. Si bien el modo de acción del efecto antidiabético aún no se ha dilucidado por completo, se cree que los efectos de la IL-22 en el hígado (gluconeogénesis y lipogénesis hepáticas) son un contribuyente importante.

También se demostró que la ingesta de alimentos se reducía mediante el tratamiento con un derivado de la invención, demostrando así la eficacia como tratamiento de la obesidad.

También se observó que los biomarcadores de participación objetivo estaban regulados por incremento por los derivados y hFc-hIL-22. Se sabe que los biomarcadores particulares medidos en los ratones db/db se traducen al hombre.

Es importante tener en cuenta que la semivida circulante ($T_{1/2}$) de hFc-hIL-22 administrado por vía subcutánea es más alta que para el Derivado 1, específicamente en ratones ($T_{1/2}$ de 20 y 8 horas, respectivamente; consulte la Tabla 7). Por lo tanto, la exposición de hFc-hIL-22 es mayor en estado estacionario. Esto se corrobora aún más

con la observación de que los biomarcadores de participación objetivo (haptoglobina, SAP y PYY) fueron más altos en el grupo hFc-hIL-22 que en el grupo del Derivado 1 (Figura 7), lo que demuestra una mayor participación del objetivo *per se* en el experimento mostrado. Por lo tanto, a pesar de una mayor exposición y participación
5 objetivo, la eficacia de la fusión Fc (hFc-hIL-22) fue inferior, en comparación con el derivado de la invención (Derivado 1), en los últimos tres días de un estudio de dosificación de 16 días.

Por lo tanto, los datos muestran que los derivados de la invención demuestran una buena eficacia terapéutica en un modelo de ratón con diabetes y enfermedad
10 hepática. Como se sabe que los biomarcadores particulares medidos en los ratones db/db se traducen al hombre, es razonable predecir que tal eficacia terapéutica también se traduce.

Ejemplo 4 – Estudio de eficacia *in vivo* en lesiones hepáticas (i)

Este estudio fue diseñado para investigar el efecto de la dosificación con
15 derivados de la invención en un modelo de ratón con lesión hepática. El estudio se realizó en modo preventivo, lo que significa que la lesión hepática solo se indujo después de que se había iniciado la dosificación.

Métodos

Se obtuvieron ratones C57Bl/6Rj de 10 semanas de edad y se aclimataron
20 durante una semana antes del inicio del estudio. Se indujo daño hepático con una sola dosis intraperitoneal (300 mg/kg, 20 ml/kg) de APAP. Los derivados de prueba de IL-22 (derivados 1 y 6) se dosificaron a 1,5 mg/kg por vía subcutánea dos horas antes de la dosificación de APAP, junto con los controles del vehículo (n = 5-10). El estudio finalizó 24 horas después de la dosificación de APAP. Se aseguró un sangrado terminal para
25 medir la alanina transaminasa (ALT) y la aspartato transaminasa (AST) en plasma.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados y el plasma se separó y almacenó a -80°C hasta su análisis. La ALT y la AST se midieron con kits comerciales (Roche Diagnostics) en el autoanalizador COBAS c501 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los hígados se sometieron a fijación con formalina e incrustada en parafina para el análisis histológico.

La proliferación se midió mediante tinción inmunohistoquímica (IHC) con ki67. La tinción IHC positiva se cuantificó mediante análisis de imágenes utilizando el software
5 VIS (Visiopharm, Dinamarca).

La apoptosis se midió en un ensayo de corte y etiquetado de extremo de dUTP de la desoxinucleotidil transferasa (TUNEL). En resumen, los portaobjetos con secciones incrustadas en parafina se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en series de etanol graduado. Los portaobjetos se trataron previamente con proteinasa K y
10 la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno. Se agregó la mezcla TUNEL (Kit de detección de muerte celular in situ, POD, Roche) a los portaobjetos, seguido de amplificación con peroxidasa de rábano picante (HRP) y visualización con diaminobencidina (DAB) (Chromogen). Finalmente, los portaobjetos se contrastaron con hematoxilina y se cubrieron con cubreobjetos.

15 *Resultados*

Los niveles de plasma de ALT y AST al final del estudio se muestran en las Figuras 9A y 9B, respectivamente. Se demostró que la cantidad de ALT y AST se redujo significativamente en ratones tratados con Derivado 1 o 6 antes de la lesión hepática en comparación con el control de vehículo/APAP.

20 La cantidad de células TUNEL- y ki67-positivas al final del estudio se muestran en las Figuras 10A y 6B, respectivamente. Se demostró que la cantidad de células TUNEL-positivas se redujo (significativamente) en ratones tratados con Derivado 1 o 6 antes de la lesión hepática en comparación con el control de vehículo/APAP. La cantidad de células ki67-positivas fue comparable entre los grupos tratados con APAP.

25 *Conclusión*

ALT y AST son enzimas hepáticas utilizadas como indicadores de daño hepático. Por lo tanto, se demostró que los derivados 1 y 6 protegen el hígado contra el daño inducido por APAP.

30 Los resultados del ensayo TUNEL mostraron que los Derivados 1 y 6 protegían contra la apoptosis causada por daño hepático en comparación con el control de

vehículo/APAP. Sin embargo, la proliferación celular no se vio afectada por estos derivados de IL-22. Como la proliferación aumenta fisiológicamente como respuesta a la lesión (como se ve en el control), los resultados demuestran la acción proliferativa de los Derivados 1 y 6, ya que la lesión reducida no va seguida de una proliferación reducida (la proporción de proliferación sobre lesión aumenta).

Por lo tanto, los datos muestran que los derivados de la invención demuestran una buena eficacia para proteger contra la lesión hepática en un modelo de ratón. Los biomarcadores particulares medidos en los ratones se traducen al hombre, por lo tanto es razonable predecir que la protección observada también se traducirá.

10 **Ejemplo 5 – Estudio de eficacia *in vivo* en lesiones pulmonares**

Este estudio fue diseñado para investigar el efecto de la dosificación con un derivado de la invención en un modelo de rata con lesión pulmonar. El estudio se realizó tanto en modo preventivo como de tratamiento, lo que significa que la dosificación se inició antes de que se indujera la lesión pulmonar y continuó a partir de entonces.

Métodos

Para inducir lesión pulmonar, se administraron 100 µl de bleomicina a los pulmones de ratas macho Sprague Dawley mediante aspiración orofaríngea como dosis única el Día 1 (Grupos 2 a 6). Se administró solución salina como control negativo (Grupo 1).

Los animales de los Grupos 3, 4 y 5 recibieron dosis (por inyección subcutánea) una vez al día con Derivado 6 a 0,5, 1,5 o 4,5 mg/kg respectivamente, desde el Día -1 hasta el Día 3. Los animales del Grupo 6 recibieron dosis (por sonda oral) una vez al día con prednisolona a 10 mg/kg desde el día -1 al día 3.

Para medir el colágeno soluble en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de las ratas, se lavaron los pulmones (3 x 4 ml) con PBS estéril (sin calcio ni magnesio), incluido un cóctel inhibidor de proteasa agregado, y los lavados por animal se colocaron en un tubo. El colágeno soluble se midió en el sobrenadante BALF utilizando el ensayo de colágeno soluble Sircol S1000 (Biocolor) (Charles River Laboratories).

Todos los animales se sometieron a necropsia el día 4 (eutanasia terminal). El pulmón derecho se recogió para el examen histopatológico de todos los animales y se fijó por inflación con formalina amortiguada neutra (NBF) al 10% antes de ser fijado por inmersión en NBF. Se recortaron tres secciones longitudinales paralelas del lóbulo pulmonar caudal derecho y se montaron en el casete 01. Los lóbulos pulmonar craneal derecho, medio y accesorio también se seccionaron longitudinalmente y se montaron en el casete 02.

Se hicieron dos portaobjetos de cada casete; un portaobjetos se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E), mientras que el otro se tiñó con hematoxilina y rojo picrosirius (H&PSR).

Luego, a cada diapositiva se le asignó un número aleatorio utilizando un generador de números aleatorios. La clave de identificación se registró en una hoja de cálculo de Microsoft Excel y se entregó una copia al patólogo del estudio después de la evaluación del portaobjetos. Por lo tanto, las seis secciones por pulmón se leyeron a ciegas.

Luego, un patólogo veterinario calificó cada sección en cada portaobjetos teñido con H&E según la gravedad de la inflamación (donde 0 = ausente, 1 = mínimo, 2 = leve, 3 = moderado y 4 = severo). Se calculó la puntuación media y mediana por grupo. El patólogo también calificó cada sección de cada portaobjetos teñido con H&PSR según la gravedad de la fibrosis (usando una puntuación de Ashcroft modificada de 0=baja a 8=alta). Se calculó la puntuación media y mediana por grupo y se sometió a ANOVA no paramétrico, y a un análisis posterior a la prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados

En la Tabla 14 se muestra un resumen de los hallazgos microscópicos, que revela las puntuaciones medias y medianas de inflamación y fibrosis para cada grupo.

Grupo	1 solució n salina/ vehícul o	2 Bleo / vehícul o	3 Bleo / Derivado 6 0,5 mg/kg	4 Bleo / Derivado 6 1,5 mg/kg	5 Bleo / Derivad o 6 4,5 mg/kg	6 Bleo / Pred
--------------	--	-----------------------------------	--	--	---	--------------------------

Inducida por fibrosis	Solución salina	Bleomicina				
Cant. de animales examinados	10	10	10	10	10	10
Inflamación						
Media del grupo	0,1	1,6	1,3	1,3	1,0	1,1
Mediana del grupo	0,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fibrosis						
Media del grupo	0,0	1,2	0,8	0,9	0,7	0,9
Mediana del grupo	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0

Tabla 14: Resumen de hallazgos microscópicos en un modelo de rata con lesión pulmonar

Tal como se evidencia al comparar los Grupos 1 y 2 en la Tabla 14, la bleomicina indujo tanto la inflamación pulmonar como la fibrosis en el modelo de rata. Las puntuaciones media y mediana fueron más bajas en los Grupos 3-5, es decir, ratas tratadas con el Derivado 6, un derivado de la invención. Estas puntuaciones más bajas fueron comparables con las observadas en ratas tratadas con prednisolona (Grupo 6).

Las puntuaciones medianas de inflamación y fibrosis para cada animal en el estudio también se muestran en la Figura 11A y 11B, respectivamente.

Tal como se ilustra en la Figura 11A, la puntuación de inflamación mediana del Grupo aumentó en los controles de bleomicina/vehículo (Grupo 2) en comparación con los controles negativos (Grupo 1). Las puntuaciones de inflamación medianas del Grupo se redujeron en las ratas tratadas con el Derivado 6 (y se redujeron significativamente

en el Grupo 5 de dosis alta) y prednisolona (Grupo 6) en comparación con los controles de bleomicina/vehículo.

5 Tal como se ilustra en la Figura 11B, la puntuación de fibrosis mediana del Grupo aumentó en los controles de bleomicina/vehículo (Grupo 2) en comparación con los controles negativos (Grupo 1). Sin embargo, las puntuaciones de fibrosis medianas del Grupo se redujeron en las ratas tratadas con el Derivado 6 (y se redujeron significativamente en el Grupo 5 de dosis alta) en comparación con los controles de bleomicina/vehículo pero no con la prednisolona de control.

10 Tal como se ilustra en la Figura 11C, la cantidad de colágeno soluble en BALF después de que la lesión pulmonar inducida por bleomicina aumentó en los controles de bleomicina/vehículo (Grupo 2) en comparación con los controles negativos (Grupo 1), y esto no se redujo con el tratamiento con prednisolona (Grupo 6). Sin embargo, se observó una cantidad significativamente reducida de colágeno soluble en BALF de ratas tratadas con el Derivado 6 (en todas las dosis probadas) en comparación con los
15 controles de bleomicina/vehículo. Dado que el colágeno soluble en BALF es una lectura de fibrosis, estos resultados confirman los datos histológicos informados inmediatamente antes.

Conclusión

20 Los resultados de los estudios microscópicos mostraron que los derivados de la invención son capaces de prevenir y/o reducir la inflamación y fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en un modelo de rata. Los efectos observados con respecto a la inflamación fueron comparables a los observados con la prednisolona, un corticoesteroide conocido por tratar la inflamación pulmonar. Sin embargo, los derivados de la invención tuvieron una acción única sobre la fibrosis, no vista con la
25 prednisolona.

Ejemplo 6 – Estudio de eficacia *in Vivo* en Colitis

Este estudio fue diseñado para investigar el efecto de la dosificación con un derivado de la invención en un modelo de ratón con colitis. El estudio se realizó tanto en modo preventivo como de tratamiento, lo que significa que la dosificación se inició el
30 mismo día que se indujera la inflamación de colon y continuó a partir de entonces.

Métodos

Los ratones hembra C57Bl/6JRj alimentados con comida para ratones se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos (n=8 por grupo) en función del peso corporal. Se usó DSS para inducir colitis en cuatro de los cinco grupos. Estos ratones
5 recibieron DSS en su agua para beber durante siete días desde el día 0 al 6 del estudio. En el quinto grupo, los animales recibieron agua sin DSS y, por lo tanto, sirvieron como controles sanos. Desde el día 0 del estudio, los ratones DSS se trataron con vehículo, un derivado de prueba de IL-22 (Derivado 6; a 0,35 mg/kg o 1 mg/kg administrado por vía intraperitoneal) o una fusión de IL-22-Fc como comparador (hFc-hIL -22; a 0,5
10 mg/kg dosificados por vía intraperitoneal) una vez al día durante 10 días. Se controló diariamente el peso corporal y la ingesta de alimentos y agua.

El día de estudio 10, se recolectaron las muestras de sangre de los ratones en tubos de EDTA y el plasma se separó y almacenó a -80 °C hasta el análisis. La proteína 3 gamma derivada de islotes regeneradores (Reg3g) se midió por duplicado usando un
15 kit ELISA (Cloud-Clone Corp), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Reg3g es un marcador de participación objetivo de IL-22.

Al terminar, se extrajeron los intestinos para el análisis estereológico. Por consiguiente, el intestino se enjuagó con solución salina helada y su contenido se eliminó suavemente antes del muestreo.

20 El intestino se infiltró en formalina durante la noche (Tissue-Tek VIP) y posteriormente se incrustó en bloques de parafina. Luego se tomaron muestras del intestino fijado en formalina desde la dirección proximal a la distal utilizando los principios de muestreo aleatorio uniforme sistemático (SURS), lo que dio como resultado un total de cuatro placas y se colocó en un casete múltiple. Todas las láminas
25 de tejido se colocaron de tal manera que la identificación de las láminas individuales fue posible en una etapa posterior. Se recortaron los bloques de parafina y se cortaron secciones superiores de 5 µm y se montaron en lentes de objeto Superfrost+. Para el intestino grueso, se cortó otra sección con una distancia de 500 µm a la sección superior, dando así lugar a un total de ocho secciones de colon de cada animal.

El volumen de inflamación del colon se midió estereológicamente, es decir, utilizando una interpretación tridimensional de secciones transversales bidimensionales del colon. La estimación del volumen estereológico se realizó utilizando el sistema newCAST (Visiopharm) en portaobjetos escaneados teñidos con H&E. El volumen intestinal total, el volumen de la mucosa, el volumen de la submucosa y muscular y el volumen del tejido inflamado se estimaron mediante el conteo de puntos utilizando un sistema de cuadrícula de tamaño apropiado, donde se contaron todos los puntos que golpeaban la estructura de interés. El número de puntos que tocan la estructura de interés se convirtió en volumen de acuerdo con la siguiente relación matemática:

$$Vol_{ref} = \sum p \cdot A(p) \cdot t$$

donde A(p) es el área por punto, p es el número total de puntos que tocan la estructura de interés y t es la distancia entre secciones. Se calculó el volumen de inflamación medio por grupo y se sometió a análisis estadístico.

La morfología del colon también se evaluó en la terminación mediante la visualización de los portaobjetos teñidos con H&E.

Resultados

El volumen de inflamación del colon se muestra en la Figura 12. Se demostró que la inflamación se previene en ratones tratados con el Derivado 6, en cualquier dosis, en comparación con el control del vehículo (que también contiene DSS). En particular, la inflamación se mantuvo en niveles normales en los grupos tratados con el Derivado 6, como lo demuestra el mismo volumen de inflamación del colon para los grupos tratados que para los controles sanos (vehículo sin DSS). Lo mismo sucedió con el grupo tratado con hFc-hIL-22.

En la Figura 13 se muestran imágenes representativas de tinción con H&E de la morfología del colon al finalizar. Después del tratamiento con DSS, se pueden observar heridas en el epitelio de la mucosa en los animales tratados con vehículo (marcados con una flecha negra), pero no en los animales tratados con el Derivado 6 en cualquier dosis o con hFc-hIL-22. Esto demuestra un efecto protector sobre el tejido epitelial.

Los niveles de Plasma Reg3g se muestran en la Figura 14. El tratamiento con DSS indujo un aumento en los niveles basales de Reg3g (comparar vehículo con sin vehículo DSS). No se detectó ningún aumento adicional en el grupo de dosis baja (0,35 mg/kg) del Derivado 6, pero se observó en el grupo de dosis más alta (1 mg/kg) del Derivado 6 y en el grupo de hFc-hIL-22. Los niveles más altos de Reg3g en el grupo hFc-hIL-22 (0,5 mg/kg) en comparación con el grupo del Derivado 6 (1 mg/kg) indicaron una mayor participación en el objetivo a pesar de la dosis más baja, lo que probablemente se relacionó con la semivida más larga en ratones de hFc-hIL-22 ($T_{1/2}$ de 30 horas para hFc-hIL-22 frente a 9,1 horas para el Derivado 6).

Conclusión

Por lo tanto, los datos muestran que un derivado de la invención demuestra una buena eficacia para proteger contra la colitis y herida epitelial de la mucosa en un modelo de ratón. Esto indica que se ha encontrado un tratamiento nuevo y mejorado para enfermedades, trastornos y afecciones intestinales. En particular, los hallazgos demuestran el potencial para tratar enfermedades caracterizadas por daño epitelial de la mucosa, tal como la enfermedad inflamatoria intestinal.

Ejemplo 7 – Estudio de eficacia *in vivo* en lesiones hepáticas (ii)

Este estudio fue diseñado para investigar el efecto de la dosificación con un derivado de la invención en un segundo modelo de ratón con lesión hepática (el primero se describe anteriormente en el Ejemplo 4). El estudio se realizó en modo preventivo, lo que significa que la lesión hepática solo se indujo después de que se había iniciado la dosificación.

Métodos

Los ratones macho C57Bl6/6j se dividieron en cinco grupos (n=8 por grupo). Un derivado de prueba de IL-22 (Derivado 1) se dosificó a 1 mg/kg por vía intraperitoneal en dos de los cinco grupos a -26 horas y -2 horas en relación con el tratamiento ConA. Otros dos grupos recibieron vehículo solo en estos puntos de tiempo. Se administró ConA a los cuatro grupos como un bolo intravenoso durante un período de 30 segundos a una dosis de 15 mg/kg, para inducir daño hepático. El quinto grupo no recibió ConA (solo vehículo, como anteriormente), como controles sanos.

8 o 24 horas después de la inyección de ConA, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se extrajo el volumen máximo de sangre mediante punción cardíaca (utilizando un tubo de gel de suero de polipropileno que contenía un activador de coágulos). Los ratones que no recibieron tratamiento (Grupo 5) se sacrificaron en el punto de tiempo de 8 horas. La sangre se mezcló con el agente activador de la coagulación en cada tubo al invertir el tubo varias veces. El tubo se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se midieron ALT y AST en las muestras de suero usando un sistema automatizado (Konelab 20) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 *Resultados*

Los niveles de plasma de ALT y AST al final del estudio se muestran en las Figuras 15A y 15B, respectivamente. Se demostró que la cantidad de ALT y AST se redujo en ratones tratados con Derivado 1 antes de la lesión hepática en comparación con el control de vehículo/ConA, en ambos puntos temporales evaluados.

15 *Conclusión*

ALT y AST son enzimas hepáticas utilizadas como indicadores de daño hepático. Por lo tanto, se demostró que el Derivado 1 protege al hígado contra la lesión inducida por ConA, tal como lo había hecho contra la lesión inducida por APAP en el Ejemplo 4. Los biomarcadores particulares medidos en los ratones se traducen al hombre, por lo tanto es razonable predecir que la protección observada también se traducirá.

20 **Ejemplo 8 - Estudio de eficacia *in vivo* en obesidad y NASH**

Este estudio fue diseñado para investigar el efecto de la dosificación con un derivado de la invención en un modelo de ratón obeso y NASH. El estudio se realizó en modo de tratamiento (no preventivo), lo que significa que la patología de obesidad y NASH se desarrolló antes de que se iniciara la dosificación.

Métodos

El modelo de ratón obeso inducido por dieta se basó en ratones macho C57BL/6JRj, que fueron alimentados con una dieta rica en grasas durante al menos 30 semanas antes del experimento. La dieta era rica en grasas (40 %), fructosa (22 %) y

colesterol (2 %) (Research Diets D09100310). Esto resultó en obesidad, NAFLD y finalmente NASH.

Los animales se alojaron en alojamientos individuales seis días antes de la primera dosis del derivado de prueba (u otro) y el peso corporal se controló diariamente durante todo el experimento. Los ratones se dividieron en seis grupos (n = 12 por grupo). La dosificación se inició el día 0 del estudio (indicado con la línea de puntos en la Figura 16) y se administró una vez al día por vía subcutánea en las siguientes dosis.

Se usó semaglutida, un agonista del receptor GLP-1 de acción prolongada, como control positivo en un primer grupo y también se investigó en combinación con un derivado de prueba de IL-22 (Derivado 6) en un segundo grupo. La dosis de semaglutida se ajustó gradualmente de acuerdo con el siguiente programa: 0,6 nmol/kg día 0 - 1,2 nmol/kg día 1 - 2,4 nmol/kg día 2 - 4,8 nmol/kg día 3 - 12 nmol/kg día 4 - 30 nmol/kg día 5. En el grupo de combinación, la dosificación de semaglutida se inició en el día 0 y la dosificación del Derivado 6 se inició en el día 12 (indicada con una línea de puntos en la Figura 16) después de que la pérdida de peso se estabilizara en el grupo tratado con semaglutida.

La dosificación del Derivado 6 en un tercer grupo de "dosis alta" se ajustó gradualmente de acuerdo con el siguiente programa: 0,05 mg/kg día 0 – 0,1 mg/kg día 1 – 0,15 mg/kg día 2 – 0,2 mg/kg día 3 – 0,25 mg/kg el día 4. La dosis se cambió de 0,25 mg/kg a 0,1 mg/kg el día 14 (indicada con una línea de puntos en la Figura 16). En un cuarto grupo de "dosis baja", la dosificación del Derivado 6 comenzó a 0,05 mg/kg sin más titulación.

En un quinto grupo, la dosificación de una fusión IL-22-Fc (hFc-hIL-22) como comparador se ajustó gradualmente de acuerdo con el siguiente programa: 0,02 mg/kg día 0 – 0,04 mg/kg día 1 – 0,06 mg/kg día 2 – 0,08 mg/kg día 3 – 0,1 mg/kg día 4. La dosis de hFc-hIL-22 se eligió para que coincidiera con el grupo de 0,25 mg/kg del Derivado 6 para la participación objetivo en función de la semivida más larga y, en consecuencia, una mayor participación con el objetivo en comparación con el Derivado 6, como se ve en el Ejemplo 6 (ver la Figura 14).

El sexto grupo recibió dosis de vehículo solo como controles negativos.

Los niveles de triglicéridos (TG) en plasma se midieron al inicio (día -2), la semana 2 (día 14) y la semana 4 (día 28) después del inicio de la dosificación. Específicamente, las muestras de sangre de la cola se recolectaron para su análisis presionando un volumen de sangre de la cola igual o inferior a 200 µl en un tubo Microvette abierto (100 µl o 200 µl) tratado con el anticoagulante apropiado. La sangre se colocó a 4 °C hasta que se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes de plasma se transfirieron a tubos nuevos e inmediatamente se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C. Los niveles de TG se midieron con kits comerciales (Roche Diagnostics) en el autoanalizador cobas® c 501 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

El peso corporal durante el transcurso del experimento se ilustra en la Figura 16.

El estudio demostró una alta eficacia dependiente de la dosis del Derivado 6 para reducir el peso corporal en el modelo de ratón obeso. Además, demostró aditividad a un agonista del receptor de GLP-1 (semaglutida), que se está investigando en ensayos clínicos de última etapa para el tratamiento de la obesidad. Los datos sugirieron la superioridad del Derivado 6 en comparación con hFc-hIL-22 para inducir la pérdida de peso. Es importante destacar que hFc-hIL-22 tiene una semivida más larga en ratones que el Derivado 6, y ha demostrado una mayor participación con el objetivo incluso cuando se administra a la mitad de la dosis del Derivado 6. Por lo tanto, la dosis de 0,1 mg/kg de hFc -hIL-22 utilizada en este estudio se eligió para una participación objetivo similar al del grupo del Derivado 6 de 0,25 mg/kg.

La sensibilidad a la pérdida de peso inducida por el Derivado 6, aquí observada en ratones obesos inducidos por dieta, no se observa en ratones delgados. Por ejemplo, en un estudio de colitis inducida por DSS de 10 días (Ejemplo 6) con una dosis diaria, el peso corporal al inicio del estudio era de 19,0 g tanto en el grupo DSS/vehículo como en el grupo DSS/Derivativo 6 (0,35 mg/kg). Al final del estudio, el peso corporal era de 17,6 gramos en el grupo DSS/vehículo en función de 17,4 gramos en el grupo DSS/Derivado 6 (0,35 mg/kg), que no son diferentes ($p = 0,82$ en la prueba t de Student no emparejada). En comparación, los ratones de los grupos de vehículo y Derivado 6

(0,25 mg/kg) en el día 10 del presente estudio tenían pesos corporales de 43,5 g y 35,2 g, respectivamente. Por lo tanto, se observó una pérdida de peso significativa en el grupo del Derivado 6 en comparación con el grupo del vehículo ($p < 0,0001$ en la prueba t de Student no emparejada para el peso corporal en el día 10). Al inicio del estudio, el peso corporal era similar en el grupo del vehículo frente al grupo del Derivado 6 (44,3 g y 44,1 g, respectivamente).

Los niveles de TG en plasma medidos al inicio (día -2), la semana 2 (día 14) y la semana 4 (día 28) después del inicio de la dosificación, se muestran en la Tabla 15.

	Vehículo		hFc-hIL-22		Derivado 6 (0,05 mg/kg)		Derivado 6 (0,25/ 0,1 mg/kg)		Semaglutida (30 nmol/kg)		Semaglutida (30 nmol/kg) + Derivado 6 (0,05 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Punto de referencia	0,75	0,033	0,85	0,036	0,83	0,045	0,77	0,035	0,81	0,036	0,86	0,046
Semana 2	1,00	0,059	0,68	0,043	0,58	0,038	0,52	0,027	0,65	0,037	0,46	0,033
Delta semana 2	+0,24	0,071	-0,18	0,047	-0,25	0,050	-0,25	0,050	-0,15	0,046	-0,41	0,066
Semana 4	0,93	0,076	0,84	0,046	0,54	0,030	0,42	0,030	0,66	0,04	0,34	0,03

										8		2
Delta seman a 4	+0,1 7	0,0 79	- 0,02	0,0 59	- 0,30	0,0 34	- 0,35	0,0 52	- 0,14	0, 06 6	-0,53	0, 04 2

Tabla 15: Niveles de TG en plasma (nmol/l) en un modelo de ratón obeso y NASH

Delta se refiere al cambio en el nivel de TG (nmol/l) desde el valor inicial para el tratamiento y el punto de tiempo indicados. Tal como se puede ver en la Tabla 15, el cambio en el nivel fue positivo (aumentó) para el grupo de vehículos, pero negativo (disminuyó) para todos los demás grupos.

El derivado 6 tuvo una mayor eficacia en la reducción de los niveles de TG que la semaglutida, también en la dosis baja, que provoca una menor pérdida de peso que la semaglutida (por ejemplo, niveles de delta TG en la semana 4 (nmol/l) de $-0,14 \pm 0,066$ para semaglutida, $-0,30 \pm 0,034$ para Derivado 6 (0,05 mg/kg) y $-0,35 \pm 0,052$ para Derivado 6 (0,25 / 0,1 mg/kg)). Los resultados muestran que el Derivado 6 tuvo una alta eficacia en la reducción de TG, que es parcialmente independiente del efecto de pérdida de peso. Además, hubo una aditividad total del efecto del Derivado 6 sobre la semaglutida. En la semana 4, la disminución de los niveles de TG (nmol/l), calculados como delta TG, fue de $-0,30 \pm 0,034$ para el Derivado 6 (0,05 mg/kg), $-0,14 \pm 0,066$ para semaglutida y $-0,53 \pm 0,042$ para semaglutida + Derivado 6 (0,05 mg/kg). Los resultados de la disminución de TG en comparación con la línea de base (delta TG) se produjeron a pesar de que los niveles de TG en el grupo del vehículo aumentaron durante el transcurso del estudio.

Conclusión

El estudio demostró que un derivado de la invención (Derivado 6) puede inducir la pérdida de peso en ratones obesos de manera dependiente de la dosis al menos a un nivel comparable al observado con semaglutida, un agonista del receptor GLP-1 de acción prolongada utilizado como control positivo. Además, hubo un efecto aditivo sobre la pérdida de peso usando una combinación de semaglutida y el Derivado 6. La eficacia del Derivado 6 para inducir la pérdida de peso fue mayor que la observada con hFc-IL-

h22 en dosis elegidas para proporcionar un nivel similar de participación del objetivo. La pérdida de peso inducida por el Derivado 6 en ratones obesos inducidos por dieta no se observó en ratones delgados tratados con DSS, lo que demuestra que los ratones obesos son más sensibles a la pérdida de peso inducida por el Derivado 6. Como la
5 pérdida de peso corporal observada en ratones obesos inducidos por la dieta es la misma lectura que se usaría en el hombre, es razonable predecir que la pérdida de peso observada también se traduciría.

El Derivado 6 también mostró una alta eficacia en la reducción de los niveles de TG. El Derivado 6, en ambas dosis probadas, mostró una mayor eficacia que la
10 semaglutida y se observó una aditividad total sobre la eficacia en la dosificación combinada. Dado que la dosis de 0,05 mg/kg del Derivado 6 tuvo una mayor eficacia que la semaglutida a pesar de una menor pérdida de peso, se puede concluir que el efecto reductor de TG del Derivado 6 fue al menos parcialmente independiente de la pérdida de peso. Además, el Derivado 6 fue superior al comparador hFc-hIL-22 en
15 ambas dosis probadas. Como la disminución de TG observada en ratones obesos inducidos por la dieta era la misma lectura que se usaría en el hombre, es razonable predecir que el efecto observado también se traduciría. Por lo tanto, los resultados indican que se ha encontrado un nuevo tratamiento para los trastornos y condiciones caracterizados por altos niveles de TG.

20 Aunque ciertas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente, a los expertos en la técnica se les ocurrirán muchas modificaciones y equivalentes. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones pretenden cubrir todas las modificaciones y equivalentes que caen dentro del verdadero espíritu de la invención.