

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291145** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.01

(51) Int. Cl. *C07K 14/54* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.11.09

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-22**

(31) **19207766.7**

(32) **2019.11.07**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/081523**

(87) **WO 2021/089875 2021.05.14**

(71) Заявитель:
СЮТОКИ ФАРМА АПС (DK)

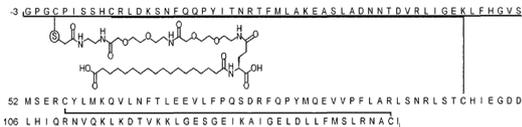
(72) Изобретатель:

**Сасс-Орум Кристиан, Ёргенсен
Расмус, Ёргенсен Себастиан Бек,
Тёгерсен Хеннинг, Хёг-Йенсен Томас,
Сандрини Майкл Паоло Бастнер (DK)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к новым производным интерлейкина-22 (IL-22), в частности тем, которые содержат жирную кислоту, ковалентно присоединенную к белку IL-22, и их применению в терапии.



**202291145
A1**

**202291145
A1**

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-22

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к новым производным интерлейкина-22 (IL-22) и, в частности, к производным, содержащим жирную кислоту, ковалентно присоединенную к белку IL-22. Изобретение также охватывает способы их получения и применения в терапии, включая лечение, профилактику и облегчение метаболических, печеночных, легочных, кишечных, почечных и кожных заболеваний, расстройств и состояний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

IL-22 представляет собой белок из 146 аминокислот с молекулярной массой 17 кДа. Он принадлежит к семейству цитокинов IL-10 и избирательно активирует гетеродимерный рецептор, состоящий из субъединицы В рецептора IL-10 (IL-10RA2), которая экспрессируется повсеместно, и субъединицы А рецептора IL-22 (IL-22RA1), которая имеет ограниченную эпителием экспрессию. Это уникальный цитокин, поскольку он высвобождается из иммунных клеток, но избирательно воздействует на эпителиальные клетки. Следовательно, сигнальные пути, индуцированные IL-22, могут иметь значение в различных тканях (мишенями являются кожа, кишечник, легкие, печень, почки, поджелудочная железа и тимус), но IL-22 активирует их эпителиально-специфическим образом. Растворимый связывающий белок IL-22BP нейтрализует IL-22 и, таким образом, регулирует его действие.

IL-22 высвобождается в ответ на сигналы, отражающие химическое или механическое повреждение, т.е. активация арилугледородного рецептора в ответ на токсины окружающей среды или промежуточные соединения триптофана и активация рецепторов распознавания образов, таких как толл-подобный рецептор 4, в ответ на белки, фрагменты и дебрис из умирающих клеток или попадание патогенов. Высвобождение IL-22 дополнительно стимулируется некоторыми цитокинами, в частности IL-23 и, в меньшей степени, IL1 β . Таким образом, IL-22 секретируется в ответ на сигналы, отражающие инфекцию патогена и иммунную активацию.

Эффект IL-22 является результатом организованного участия нескольких активностей/путей. IL-22 действует на эпителиальные барьерные ткани и органы при повреждении, защищая клетки и поддерживая барьерную функцию (например, посредством активации программ антиапоптотических генов). Он также ускоряет репарацию (например, индуцируя пролиферацию зрелых клеток и активацию стволовых клеток), предотвращает фиброз (например, уменьшая эпителиально-мезенхимальный переход, противодействуя инфламмасоме NLRP3 и индуцируя старение звездчатых клеток

печени) и контролирует воспаление (например, индуцируя антимикробные пептиды и сигналы хемотаксиса). Сообщалось, что IL-22 способен лечить ряд заболеваний, в том числе те, которые часто наблюдаются у млекопитающих с диабетом или избыточной массой, такие как гипергликемия, гиперлипидемия и гиперинсулинемия.

Однако IL-22 обычно быстро выводится из организма почками, что ограничивает его применение в клинической практике. Поэтому известные способы продления периода полужизни циркулирующего IL-22 направлены на искусственное увеличение размера IL-22 выше 70 кДа, чтобы избежать почечного клиренса. Лигирование IL-22 с Fc-фрагментом антитела в настоящее время является лучшим решением для достижения этого эффекта; Genentech и Generon Shanghai имеют гибриды IL-22-Fc длительного действия, находящиеся в клинической разработке. Модификация IL-22 полиэтиленгликолем (пэгилирование) является другим известным способом предотвращения почечного клиренса.

Однако эти существующие решения не лишены недостатков. Имеющиеся данные позволяют предположить, что ПЭГ сам по себе является иммуногенным и в клетках с пэгилированными биологическими препаратами наблюдаются ПЭГ-содержащие вакуоли. Пониженная активность и гетерогенность также являются неблагоприятными аспектами пэгилирования. Хотя технология слияния с Fc очень хорошо известна, добавление фрагмента антитела Fc представляет собой серьезное изменение в структуре IL-22, которое влияет на его свойства после продления периода полужизни. Поскольку слияние с Fc увеличивает размер белка примерно с 17 кДа до примерно 85 кДа, могут быть затронуты такие свойства, как скорость диффузии, кинетика распределения и взаимодействия с рецептором. Например, некоторые вещества, слитые с Fc, медленно всасываются и/или слишком велики для введения определенными путями. Как Genentech, так и Generon также сообщают об умеренных и обратимых кожных реакциях как ограничивающих дозу побочных эффектах гибридов IL-22-Fc. Кроме того, на активность может влиять стерическое затруднение, вызванное большим партнером по слиянию.

Таким образом, в данной области техники сохраняется потребность в новых биосовместимых модификаторах IL-22, которые увеличивают время полувыведения в кровотоке и демонстрируют оптимизированные фармакокинетические и фармакодинамические свойства по сравнению с нативной молекулой. В идеале они должны сохранять активность и другие свойства нативной молекулы, а также избегать токсичности, иммуногенности и любых других побочных реакций, характерных для известных производных.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте предложено производное IL-22, содержащее жирную кислоту, ковалентно присоединенную к белку IL-22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения жирная кислота ковалентно присоединена к белку IL-22 с помощью линкера.

Жирная кислота может иметь Формулу I:



где x представляет собой целое число в диапазоне 10-18, необязательно 12-18, 14-16 или 16-18, и * обозначает точку присоединения к белку IL-22 или линкеру. Это может быть жирная двухосновная кислота, такая как двухосновная кислота C12, C14, C16, C18 или C20. Преимущественно жирная кислота представляет собой двухосновную кислоту C16 или C18, и наиболее предпочтительно она представляет собой двухосновную кислоту C18.

Белок IL-22 может представлять собой нативный зрелый человеческий IL-22 (далее «hIL-22») или его вариант. Вариант может представлять собой замещенную форму hIL-22, необязательно замещенную в положениях 1, 21, 35, 64, 113 и/или 114. Он может включать замену hIL-22, выбранную из группы, состоящей из A1C, A1G, A1H, N21C, N21D, N21Q, N35C, N35D, N35H, N35Q, N64C, N64D, N64Q, N64W, Q113C, Q113R, K114C и K114R. Преимущественно вариант содержит остаток Cys в положении 1 hIL-22.

Вариант может быть расширенной формой hIL-22. Он может содержать N-концевой пептид, такой как N-концевой тример. Преимущественно вариант содержит N-концевой G-P-G.

Линкер может содержать одну или более аминокислот, необязательно включая глутаминовую кислоту (Glu) и/или лизин (Lys). Линкер может включать звено оксиэтиленглицина или несколько связанных звеньев оксиэтиленглицина, необязательно 2-5 таких звеньев, преимущественно 2 звена. Линкер может содержать один или более остатков олиго(этиленгликоля) (OEG). Он может содержать группу этилендиамина (C₂DA) и/или группу ацетамида (Ac). Преимущественно линкер содержит все вышеупомянутые элементы в комбинации. В частности, линкер может представлять собой $\gamma\text{Glu-OEG-OEG-C}_2\text{DA-Ac}$, $\gamma\text{Glu-}\gamma\text{Glu-}\gamma\text{Glu-}\gamma\text{Glu-OEG-OEG-}\epsilon\text{Lys-}\alpha\text{Ac}$ или $\gamma\text{Glu-OEG-OEG-}\epsilon\text{Lys-}\alpha\text{Ac}$.

Линкер может представлять собой Cys-реактивный линкер, присоединенный к остатку Cys в hIL-22 или его варианте. Он может быть присоединен в положении -7, -5, 1, 6, 33, 113, 114 или 153 hIL-22 или его варианта (где положения -7, -5 и т. д. определены в данном документе). Например, линкер может быть присоединен к остатку Cys, замещенному в положениях 1, 6, 33, 113 или 114 hIL-22. Он может быть присоединен к остатку Cys в

положении -5, -7 или 153 относительно hIL-22. Преимущественно линкер присоединен к остатку Cys, замещенному в положении 1 hIL-22.

В одном варианте осуществления производное содержит двухосновную кислоту C14, C16, C18 или C20, ковалентно присоединенную линкером к варианту hIL-22, где вариант содержит N-концевой G-P-G и остаток Cys в положении 1 hIL-22 и линкер необязательно присоединен к указанному остатку Cys. Примерами производных по изобретению являются производные, обозначенные в данном документе как производные 1-10.

Во втором аспекте предложен способ получения производного по первому аспекту, включающий ковалентное присоединение жирной кислоты к белку IL-22.

В третьем аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая производное первого аспекта и фармацевтически приемлемый носитель.

В четвертом аспекте предложено производное первого аспекта или фармацевтическая композиция третьего аспекта для применения в терапии.

В пятом аспекте предложено производное первого аспекта или фармацевтическая композиция третьего аспекта для применения в способе лечения метаболического, печеночного, легочного, кишечного, почечного или кожного заболевания, расстройства или состояния.

Метаболическое заболевание, расстройство или состояние могут представлять собой ожирение, диабет 1 типа, диабет 2 типа, гиперлипидемию, гипергликемию или гиперинсулинемию.

Заболевание, нарушение или состояние печени может быть неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП), неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), циррозом печени, алкогольным гепатитом, острой печеночной недостаточностью, хронической печеночной недостаточностью, острой хронической печеночной недостаточностью (ОХПН), острым повреждением печени, индуцированной ацетаминофеном токсичностью печени, склерозирующим холангитом, билиарным циррозом или патологическим состоянием, вызванным хирургическим вмешательством или трансплантацией.

Легочное заболевание, расстройство или состояние может представлять собой хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), кистозный фиброз, бронхоэктазы, идиопатический легочный фиброз, острый респираторный дистресс-синдром, химическое повреждение, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию или грибковую инфекцию.

Заболевание, расстройство или состояние кишечника могут быть воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК), язвенным колитом, болезнью Крона, болезнью

«трансплантат против хозяина» (БТПХ), химическим повреждением, вирусной инфекцией или бактериальной инфекцией.

Заболевание почек, расстройство или состояние может быть острым заболеванием почек или хроническим заболеванием почек.

Кожное заболевание, расстройство или состояние может быть раной, воспалительным заболеванием или БТПХ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показана (А) двухосновная кислота C18, (В) двухосновная кислота C16 и (С) двухосновная кислота C14, каждая из которых связана с линкером, содержащим Cys-реактивную единицу. Эти комбинации жирных кислот и линкеров используются в производных по изобретению, обозначенных в данном документе как производные 1-10.

На фиг. 2 показана структура производного по изобретению, обозначенного в данном документе как производное 1.

На фиг. 3 показана структура производного по изобретению, обозначенного в данном документе как производное 6.

На фиг. 4 показана структура производного по изобретению, обозначенного в данном документе как производное 10.

На фиг. 5 показано влияние ежедневного дозирования hIL-22 и сравнительного варианта IL-22, имеющего только основные вариации (обозначенного в данном документе как компаратор 3), на уровень глюкозы в крови в 8-дневном исследовании на модели мыши с диабетом (среднее \pm SEM).

На фиг. 6 показано влияние ежедневного приема производного по изобретению (обозначенного в данном документе как производное 1) по сравнению со слитым с Fc IL-22 (в частности, человеческим Fc, слитым на N-конце с hIL-22; далее «hFc-hIL-22») на (А) уровень глюкозы в крови и (В) прием пищи в 16-дневном исследовании на модели мышей с диабетом (среднее \pm SEM; *означает $p < 0,05$ с использованием непарного t-теста).

На фиг. 7А-С показано влияние ежедневного приема производного 1 и hFc-hIL-22 на три различных биомаркера взаимодействия с мишенями в 16-дневном исследовании на модели мышей с диабетом (среднее \pm SEM; ***означает (А) $p < 0,0002$, (В) $p < 0,0003$ или (С) $p < 0,0026$ с использованием непарного t-теста).

На фиг. 8 показана кривая доза-реакция для ежедневного дозирования производного по изобретению (обозначенного в данном документе как производное 6) (три разные дозы) по сравнению с производным 1 и hFc-hIL-22 на уровень глюкозы в крови в 13-дневном исследовании в модель мыши с диабетом (среднее \pm SEM).

На фиг. 9А и В показано действие производных 1 и 6 на предотвращение повреждения печени в мышинной модели с индуцированным ацетаминофеном (АРАР) повреждением печени, о чем свидетельствуют уровни в плазме двух различных ферментов печени. Используя однофакторную линейную модель теста Даннета, * означает $p < 0,05$, а ** означает $p < 0,01$ по сравнению с носителем + АРАР.

На фиг. 10 показано действие производных 1 и 6 (А) на предотвращение апоптоза и (В) на клеточную пролиферацию в мышинной модели с АРАР-индуцированным повреждением печени. НС означает несущественный.

На фиг. 11 показано действие производного 6 на предотвращение и/или уменьшение (А) воспаления легких и (В) и (С) фиброза легких в модели повреждения легких у крыс, индуцированного блеомицином, по сравнению с преднизолоном.

На фиг. 12 показано действие производного 6 на предотвращение воспаления толстой кишки в мышинной модели колита, индуцированного декстрансульфатом натрия (DSS). **** означает $p < 0,0001$ по сравнению с носителем (содержащим DSS).

На фиг. 13 показано действие производного 6 по сравнению с hFc-hIL-22 на предотвращение повреждения эпителия слизистой оболочки в мышинной модели колита, индуцированного DSS. Увеличение 4x, масштабная линейка = 500 мкм.

На фиг. 14 показаны уровни регенерирующего островкового белка 3 гамма (Reg3g) в плазме в мышинной модели колита, индуцированного DSS, в качестве меры взаимодействия с мишенью (Reg3g является маркером взаимодействия с мишенью IL-22).

На фиг. 15А и В показано действие производного 1 на предотвращение повреждения печени в модели повреждения печени, вызванного конканавалином А (КонА), на мышах, о чем свидетельствуют уровни в сыворотке двух различных ферментов печени.

На фиг. 16 показано влияние производного 6 по сравнению с hFc-hIL-22 и известным производным GLP-1, конъюгированным с жирными кислотами, семаглутидом, на массу тела мышей с ожирением, вызванным диетой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В дальнейшем греческие буквы представлены их символом, а не письменным названием. Например, α = альфа, ε = эпсилон, γ = гамма и μ = мю. Аминокислотные остатки можно идентифицировать по их полному названию, трехбуквенному коду или однобуквенному коду, которые полностью эквивалентны.

Термин «производное IL-22», используемый в данном документе, относится к белку IL-22, имеющему ковалентно присоединенную жирную кислоту. Термин охватывает как

производные, в которых жирная кислота напрямую ковалентно связана с белком IL-22, так и производные, в которых ковалентное связывание осуществляется с помощью линкера.

Ковалентное присоединение жирных кислот представляет собой проверенную технологию увеличения периода полужизни пептидов и белков и представляет собой способ выделения жирной кислоты из пептида или белка. Он известен из имеющихся на рынке продуктов для лечения диабета 1 и 2 типа, таких как инсулины Левемир® (детемир) и Тресибя® (деглудек), а также производные глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) Виктоза® (лираглутид) и Оземпик® (семаглутид).

Присоединение жирных кислот позволяет связываться с альбумином, тем самым предотвращая почечную экскрецию и обеспечивая некоторую стерическую защиту от протеолиза. Преимущественно, он предлагает минимальную модификацию IL-22 по сравнению со слиянием с Fc или пэгилированием. В этом отношении, в то время как слияние с Fc и пэгилирование направлены на увеличение размера IL-22 выше порога почечного клиренса, производные, содержащие жирную кислоту, ковалентно присоединенную к белку IL-22, сохраняют небольшой размер, аналогичный размеру белка IL-22. Таким образом, поскольку присоединение жирной кислоты представляет собой минимальную модификацию, считается, что полученное производное сохраняет нативные свойства, включая распределение, скорость диффузии и взаимодействие с рецепторами (связывание, активация и перенос), а также минимизирует риск иммуногенности.

Как указано выше, присоединение жирных кислот доказало терапевтическую эффективность инсулина и производных GLP-1 для лечения диабета. Однако IL-22 представляет собой совершенно другой белок с точки зрения его размера, последовательности и биологических свойств. Таким образом, авторы изобретения противоречили интуиции, что жирные кислоты могут быть ковалентно присоединены к IL-22, сохраняя при этом терапевтический эффект. Было особенно неожиданно, что такая минимальная модификация IL-22 могла привести к высокой эффективности (близкой к hIL-22) в сочетании с очень длительным периодом полувыведения из кровотока.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к производному IL-22, содержащему жирную кислоту, ковалентно присоединенную к белку IL-22. Жирная кислота может быть ковалентно присоединена к белку IL-22 непосредственно или через линкер, который сам по себе может состоять из различных субъединиц. Термин «белок IL-22», используемый в данном документе, может означать нативный белок IL-22, такой как hIL-22, или его вариант. «Вариант» может представлять собой белок, имеющий

аминокислотную последовательность, аналогичную последовательности нативного белка, как дополнительно определено в данном документе.

В природе человеческий белок IL-22 синтезируется с сигнальным пептидом из 33 аминокислот для секреции. Зрелый белок IL-22 человека (т.е. hIL-22) имеет длину 146 аминокислот и имеет 80,8 % идентичность последовательности с мышинным IL-22 (последний имеет длину 147 аминокислот). Аминокислотная последовательность hIL-22 обозначена в данном документе как SEQ ID NO. 1. Как и другие члены семейства IL-10, структура IL-22 содержит шесть α -спиралей (называемых спиральями от А до F).

Таким образом, производные по изобретению могут иметь нативную аминокислотную последовательность hIL-22. В качестве альтернативы они могут иметь одну или более вариаций аминокислотной последовательности в нативной последовательности. Они могут дополнительно или альтернативно включать одну или более вариаций аминокислотной последовательности относительно нативной последовательности (т.е. вне ее). Таким образом, в одном варианте осуществления производное содержит жирную кислоту, ковалентно присоединенную к hIL-22 или его варианту.

Такие выражения, как «внутри», «относительно», «соответствует» и «эквивалентен» используются в данном документе для характеристики места изменения и/или ковалентного присоединения жирной кислоты в белке IL-22 посредством ссылки на последовательность нативного белка, например hIL-22. В SEQ ID NO. 1, первый аминокислотный остаток hIL-22 (аланин (Ala)) находится в положении 1.

Таким образом, изменение в последовательности hIL-22 представляет собой изменение любого из остатков с номерами 1-146 в SEQ ID NO 1. Например, замена Glu нативного Asp в остатке 10 в hIL-22 представлена в данном документе как «D10E». Если производное также имеет жирную кислоту, ковалентно присоединенную в положении 10, в данном документе это называется присоединением по остатку «10E».

Однако изменение, связанное с последовательностью hIL-22, является изменением, внешним по отношению к остаткам с номерами 1-146 в SEQ ID NO 1. Например, производное 2, как определено в данном документе, содержит N-концевой пептид длиной 15 аминокислот. Остатки в N-концевом пептиде пронумерованы отрицательно, начиная с остатка, присоединенного к остатку 1 в hIL-22, т.е. первый остаток в N-концевом пептиде, присоединенный к остатку 1 в hIL-22, обозначен как «-1». Таким образом, поскольку производное 2 имеет жирную кислоту, ковалентно присоединенную к 7-му остатку в N-концевом пептиде, начиная с положения -1, и это Cys, сайт ковалентного присоединения производного 2 в данном документе обозначен как «-7C». Однако, как правило, нумерация,

используемая в перечне последовательностей для производного 2, начинается с 1 в соответствии со стандартом ВОИС ST.25; таким образом, положение 1 в перечне последовательностей производного 2 фактически представляет собой остаток -7, как указано в данном документе.

Два, три, четыре, пять или более вариаций могут быть сделаны в нативной последовательности для образования производных по изобретению. Например, в этом отношении может быть сделано более 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 или даже более 125 вариаций. Любой из остатков 1-146 в нативной последовательности может быть изменен. Примерами остатков для вариации являются остатки 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 и/или 146 в hIL-22. Вариация по остаткам 1, 21, 35, 64, 113 и/или 114 особенно выгодна.

Вариации в нативной последовательности обычно представляют собой аминокислотные замены. Используемый в данном документе термин «замена» может означать замену одной аминокислоты в нативном белке на другую. Они могут быть консервативными или неконсервативными заменами. Примеры замен представляют собой 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 и/или I146V. Преимущественно замена может быть выбрана из группы, состоящей из A1C, A1G, A1H, N21C, N21D, N21Q, N35C, N35D, N35H, N35Q, N64C, N64D, N64Q, N64W, Q113C, Q113R,

K114C и K114R. Удивительно, но замены, используемые в изобретении, не оказывают неблагоприятного воздействия на активность IL-22.

Конкретные комбинации замен включают (i) A1G, N21D, N35D и 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 и 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 и I146V; (iv) A1G, N35Q и N64Q; (v) A1G и N64C; (vi) A1G и Q113C; (vii) A1G и K114C; (viii) A1G и M25L; (ix) A1G и M52L; (x) A1G и M139L; (xi) A1G и N36Q; (xii) A1G и D117E; (xiii) A1G и N21Q; (xiv) A1G и N35Q; (xv) A1G и N64Q; (xvi) A1G, N21Q и N35Q; (xvii) A1G, N21Q и N64Q; (xviii) A1G, N21Q, N35Q и N64Q; (xix) A1G и K11C; (xx) A1G и N13C; (xxi) N35Q и N64Q; (xxii) A1C, N35Q и N64Q; (xxiii) H6C, N35Q и N64Q; (xxiv) I3C, N35Q и N64Q; (xxv) P2C, N35Q и N64Q; (xxvi) L32C, N35Q и N64Q; (xxvii) N35Q, M52C и N64Q; (xxviii) N13C, N35Q и N64Q; (xxix) N21C, N35Q и N64Q; (xxx) N35Q, N64Q и N94C; (xxxi) N35Q, N64Q и P73C; (xxxii) N35Q, N64Q и Q113C; (xxxiii) N35Q, N64Q и R91C; (xxxiv) N35Q, N64Q и R110C; (xxxv) S12C, N35Q и N64Q; (xxxvi) N35Q, S51C и N64Q; (xxxvii) N35Q, S53C и N64Q; (xxxviii) N35Q, T37C и N64Q; (xxxix) N35Q, N64Q и T98C; (xxxx) Q15C, N35Q и N64Q; (xxxxi) N35C и N64Q; (xxxxii) H6C, N35Q и N64Q; (xxxxiii) A33C, N35Q и N64Q; и (xxxxiv) A1H, P2H, I3H, S4H, S5H, C7G, R8G, L9S, D10S, K11G, N13G, F14S, Q15E, Q16V, P17L, I18F, Y19Q, N21Q, R22S, F24H, 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, 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 и I146R. Любые и все комбинации замен предусмотрены и составляют часть изобретения.

Производное по первому аспекту обычно может содержать аминокислотную замену, при которой Cys заменяется нативным остатком, необязательно в любом из положений, указанных выше, например, в положении 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 и/или 127. Преимущественно белок IL-22, включенный в производное по первому аспекту, содержит остаток Cys в положении 1 hIL-22. Замена A1C в сочетании с заменами в двух сайтах гликозилирования в положениях 35

и 64 является особенно предпочтительной, поскольку она приводит к более быстрому поглощению без неблагоприятного воздействия на эффективность или время полужизни (см. производные 6 и 10 в примерах 1 и 2).

Альтернативно или дополнительно вариации в нативной последовательности могут представлять собой вставки аминокислот. В нативную последовательность может быть вставлено до пяти, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или даже до 50 аминокислот. Тримеры, пентамеры, септамеры, октамеры, нонамеры и 44-меры являются особенно предпочтительными в этом отношении. Примеры последовательностей показаны в таблице 1. Инсерции могут быть сделаны в любом месте нативной последовательности, но в спирали А (например, в остатке 30), петле CD (например, в остатке 75), спирали D (например, в остатке 85) и/или спирали F (например, в остатке 124).

п-мер	Иллюстративная аминокислотная последовательность	SEQ ID NO.
Тример	E-T-S	н/д
Пентамер	R-V-Q-F-Q или C-V-E-I-P	2, 3
Септамер	G-S-G-S-G-S-C	4
Октамер	I-E-A-L-T-P-H-S или Y-G-Q-R-Q-W-K-N	5, 6
Нонамер	V-F-I-I-N-N-S-L-E	7
44-мер	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-N	8

Таблица 1: Последовательность иллюстративных вставок аминокислот

Варианты последовательности относительно аминокислотной последовательности hIL-22, если они присутствуют, обычно включают удлинение, такое как добавление пептида на N-конце. Пептид может состоять из пяти, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или даже до 50 аминокислот. Мономеры, тримеры, октамеры, 13-меры, 15-меры, 16-меры, 21-меры, 28-меры являются особенно предпочтительными в этом отношении. Иллюстративные последовательности показаны в таблице 2. Соответственно, белок IL-22, включенный в производное по первому аспекту, содержит N-концевой G-P-G. В особенно предпочтительном примере производное по первому аспекту содержит как остаток Cys в положении 1 hIL-22 (SEQ ID NO. 1), так и N-концевой G-P-G. Было обнаружено, что это создает производное с очень хорошим периодом полувыведения и эффективностью (см. производные 1, 3 и 5 в примерах 1 и 2).

п-мер	Иллюстративная аминокислотная последовательность	SEQ ID NO.
Мономер	С, G или M	н/д
Тример	G-P-G	н/д
Октамер	G-P-A-C-E-P-E-E	9
13-мер	G-G-S-S-G-S-G-S-E-V-L-F-Q	10
15-мер	G-P-G-S-G-S-G-S-C-G-S-G-S-G-S	11
16-мер	G-G-S-S-G-S-G-S-E-V-L-F-Q-G-P-G	12
21-мер	G-G-S-S-G-S-G-S-E-V-L-F-Q-G-P-A-C-E-P-E-E	13
28-мер	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

Таблица 2: Последовательность иллюстративных N-концевых пептидов

Изменения последовательности относительно аминокислотной последовательности hIL-22, если они присутствуют, могут включать добавление пептида на С-конце. Пептид может состоять из пяти, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или даже до 50 аминокислот. Особенно предпочтительным в этом отношении является септамер, необязательно имеющий аминокислотную последовательность, G-S-G-S-G-S-C (SEQ ID NO. 15).

Производные по изобретению могут включать как N-концевой, так и С-концевой пептид в дополнение к нативной или вариантной аминокислотной последовательности hIL-22, как описано в данном документе. Любая комбинация описанных в данном документе N- и С-концевых пептидов предусмотрена и явно включена в изобретение.

Следует понимать, что изобретение распространяется на любое производное IL-22, которое содержит жирную кислоту, ковалентно присоединенную к hIL-22, или его варианту. «Вариант» может быть белком, имеющим по меньшей мере 10 % идентичности последовательности с hIL-22. В одном варианте осуществления вариант имеет по меньшей мере 20 % или даже по меньшей мере 30 % идентичности последовательности с hIL-22. Вариант может иметь «по существу аминокислотную последовательность» hIL-22, что может означать последовательность, имеющую по меньшей мере 40 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью hIL-22. Соответственно, в одном варианте осуществления производное первого аспекта имеет по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % или 100 % идентичность аминокислотной последовательности с hIL-22. Иллюстративные варианты белка IL-22, которые включены в конкретные

производные по изобретению, раскрытые в экспериментальном разделе, представлены в SEQ ID NO. 16-21.

Квалифицированный специалист оценит, как рассчитать процентную идентичность между двумя аминокислотными последовательностями. Сначала необходимо подготовить выравнивание двух последовательностей, а затем вычислить значение идентичности последовательности. Процентная идентичность для двух последовательностей может принимать разные значения в зависимости от: (i) метода, используемого для выравнивания последовательностей, например, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (реализованы в разных программах), или структурное выравнивание из 3D-сравнения; и (ii) параметры, используемые методом выравнивания, например, локальное выравнивание *по сравнению* с глобальным, используемая матрица парных оценок (например, BLOSUM62, PAM250, Gonnet и т. д.) и штраф за гэп, например, функциональная форма и константы.

После выполнения выравнивания существует множество различных способов расчета процентной идентичности между двумя последовательностями. Например, можно разделить количество идентичностей на: (i) длину кратчайшей последовательности; (ii) длину выравнивания; (iii) среднюю длину последовательности; (iv) количество положений без пропусков; или (iv) количество эквивалентных положений, исключая выступы. Кроме того, следует понимать, что процент идентичности также сильно зависит от длины. Следовательно, чем короче пара последовательностей, тем выше вероятность случайной идентичности последовательности.

Следовательно, следует понимать, что точное выравнивание аминокислотных последовательностей представляет собой сложный процесс. Популярная программа множественного выравнивания ClustalW [48, 49] является предпочтительным способом создания множественного выравнивания белков в соответствии с изобретением. Подходящими параметрами для ClustalW могут быть следующие: Для выравнивания белков: штраф за открытие разрыва = 10,0, штраф за удлинение разрыва = 0,2 и матрица = Gonnet. Для выравнивания ДНК и белков: ENDGAP = -1 и GAPDIST = 4. Специалистам в данной области известно, что может быть необходимо варьировать эти и другие параметры для оптимального выравнивания последовательностей.

Предпочтительно вычисление процентной идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно затем рассчитать из такого выравнивания, как $(N/T) \cdot 100$, где N - это количество положений, в которых последовательности имеют одинаковый остаток, а T - это общее количество сравниваемых позиций, включая гэпы, но исключая нависания. Следовательно, наиболее предпочтительный способ расчета процентной идентичности

между двумя последовательностями включает (i) подготовку выравнивания последовательностей с использованием программы ClustalW с использованием подходящего набора параметров, например, как указано выше; и (ii) введение значений N и T в следующую формулу: Идентичность последовательности = $(N/T) \cdot 100$.

Альтернативные способы идентификации подобных последовательностей будут известны специалистам в данной области техники.

Соответственно, производное первого аспекта содержит 200 аминокислот или менее. Например, производное содержит менее 190, менее 180, менее 170, менее 160 или даже менее 150 аминокислот. Подходящим образом, производное будет содержать по меньшей мере 146 аминокислот, однако это соответствует количеству аминокислот в hPL-22. Он может содержать по меньшей мере 150 аминокислот, по меньшей мере 160 аминокислот, по меньшей мере 170 аминокислот или даже по меньшей мере 180 аминокислот. Производные по изобретению могут содержать белки любой длины в указанных выше диапазонах, но обычно они имеют длину 146-180 аминокислот.

Производные по изобретению, независимо от того, имеют ли они нативную или вариантную аминокислотную последовательность, содержат жирную кислоту, ковалентно присоединенную к белку PL-22. Жирная кислота обычно ковалентно связана с белком PL-22 с помощью линкера. Жирная кислота и линкер соответствующим образом соединены друг с другом посредством амидной связи, и линкер ковалентно присоединен к белку PL-22. Таким образом, жирная кислота и линкер могут присутствовать в виде боковой цепи на белке PL-22. Авторы изобретения удивил тот факт, что ковалентно присоединенная жирная кислота не оказывает неблагоприятного воздействия на активность PL-22. Было особенно неожиданно, что присоединение жирных кислот связано с дополнительными преимуществами, такими как продление периода полувыведения.

Жирная кислота может представлять собой любую подходящую жирную кислоту. В частности, жирная кислота может иметь формулу I:



где x представляет собой целое число в диапазоне 10-18, необязательно 12-18, 14-16 или 16-18, и * обозначает точку присоединения к белку PL-22 или линкеру. Это может быть жирная двухосновная кислота, такая как двухосновная кислота C12, C14, C16, C18 или C20. Преимущественно жирная кислота представляет собой двухосновную кислоту C16 или C18, и наиболее предпочтительно она представляет собой двухосновную кислоту C18.

Например, $-(\text{CH}_2)_x-$ в формуле I может быть неразветвленным алкиленом, в котором x равно 10. Эту жирную кислоту удобно называть двухосновной кислотой C12, то есть жирной

дикарбоновой кислотой с 12 атомами углерода. В качестве альтернативы, $-(\text{CH}_2)_x-$ в формуле I может быть неразветвленным алкиленом, в котором x равно 12. Эту жирную кислоту удобно называть двухосновной кислотой C14, то есть жирной дикарбоновой кислотой с 14 атомами углерода. Подобным образом, $-(\text{CH}_2)_x-$ в формуле I может быть неразветвленным алкиленом, в котором x равно 14 (двухосновная кислота C16), 16 (двухосновная кислота C18) или 18 (двухосновная кислота C20). Соответственно, производное первого аспекта включает двухосновную кислоту C14, C16, C18 или C20; более предпочтительно двухосновную кислоту C16 или C18 и еще более предпочтительно двухосновную кислоту C18.

Двухосновная кислота может быть способна образовывать нековалентные ассоциации с альбумином, тем самым способствуя циркуляции производного в кровотоке. Более короткие двухосновные кислоты (например, двухосновная кислота C16) имеют более низкое сродство к альбумину и, следовательно, более короткий период полувыведения, чем более длинные двухосновные кислоты (например, двухосновная кислота C18). Однако они по-прежнему являются производными длительного действия с ожидаемым периодом полувыведения у человека более суток.

Присоединение жирных кислот само по себе также стабилизирует белок IL-22 против протеолитической деградациии. Получаемый в результате период полувыведения обычно подобен таковому для гибридов IL-22-Fc (т.е. значительно улучшен по сравнению с hIL-22).

Производные первого аспекта могут содержать определенные комбинации жирной кислоты и белка IL-22. Например, двухосновная кислота C14, C16, C18 или C20 может быть присоединена к белку IL-22, содержащему остаток Cys в положении 1 hIL-22 и/или N-концевой G-P-G. В одном примере производное первого аспекта содержит двухосновную кислоту C18, а белок IL-22 содержит как остаток Cys в положении 1 hIL-22, так и N-концевой G-P-G.

Как указано выше, жирная кислота подходящим образом связана с линкером, который присоединен к белку IL-22. Линкер может содержать несколько линкерных элементов, включая одну или несколько аминокислот, таких как один или несколько остатков Glu и/или Lys. Линкер может включать звено оксиэтиленглицина или несколько связанных звеньев оксиэтиленглицина, необязательно 2-5 таких звеньев, преимущественно 2 звена. Один или более остатков OEG, C₂DA и/или Ac-группы альтернативно или дополнительно могут быть включены. Линкер может содержать Cys-реактивную единицу. «Cys-реакционноспособная единица», используемая в данном документе, может означать

функциональную единицу, которая способна реагировать с атомом серы Cys с образованием ковалентной связи углерод-серы. Cys-реакционноспособная единица может иметь любую из нескольких форм, но предпочтительно содержит атом углерода, присоединенный к уходящей группе, причем эта уходящая группа замещается атомом серы Cys во время образования связи углерод-серы. Уходящая группа может представлять собой галоген, необязательно атом брома. Эта уходящая группа бромида может представлять собой альфа-группу по отношению к атамидной функциональной группе; преимущественно это бром-ацетамидная функциональная группа. Альтернативно, уходящая группа может представлять собой функционализированную гидроксильную группу в форме мезилата или тозилата или нефункционализированную гидроксильную группу. Кроме того, уходящая группа может представлять собой малеимид или другую функциональную группу. Иллюстративные линкеры включают γ Glu-OEG-OEG-C₂DA-Ac, γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu-OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac and γ Glu-OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac, но можно использовать любой подходящий линкер.

Жирная кислота или линкер может быть присоединена к любому аминокислотному остатку в белке IL-22. Иллюстративными в этом отношении являются остатки -7, -5, 1, 6, 33, 113, 114 и 153 в аминокислотной последовательности hIL-22 или относительно нее. Нативный остаток обычно заменяют на Cys или Lys, чтобы сделать возможным присоединение жирной кислоты или линкера. Альтернативно, жирная кислота или линкер могут быть присоединены к нативному остатку Cys или Lys. Соответственно, жирная кислота или линкер присоединены к остатку Cys, замещенному в положениях 1, 6, 33, 113 или 114 hIL-22, или к остатку Cys в положениях -5, -7 или 153 относительно hIL-22. В частности, жирная кислота или линкер могут быть присоединены к остатку Cys, замещенному в положении 1 hIL-22.

Присоединение жирной кислоты или линкера к белку IL-22 представляет собой ковалентное присоединение. Например, Cys-реактивная жирная кислота или линкер могут быть использованы для присоединения жирной кислоты или линкера к остатку Cys в белке IL-22. Жирная кислота или линкер могут быть ковалентно присоединены к атому серы остатка Cys через тиоэфирную связь. В качестве альтернативы, Lys-реактивная жирная кислота или линкер могут быть использованы для присоединения жирной кислоты или линкера к остатку Lys в белке IL-22. Альтернативно, жирная кислота или линкер могут быть ковалентно присоединены к свободной аминогруппе (-NH₂) на N-конце белка IL-22 (независимо от аминокислоты в положении 1). Присоединение может происходить так же, как присоединение Cys, хотя и с субстехиометрическими количествами жирной кислоты

или линкера, содержащего подходящие N-реактивные соединения. Жирная кислота или линкер могут быть представлены в форме альдегида (N-реактивные частицы) и ковалентно присоединены к свободному амину с использованием классически известного восстановительного аминирования.

Таким образом, производное первого аспекта соответствующим образом содержит двухосновную кислоту C14, C16, C18 или C20, присоединенную линкером к варианту hIL-22, где вариант содержит N-концевой G-P-G и остаток Cys в положении 1 hIL-22. и линкер необязательно присоединен к остатку Cys.

Иллюстративные производные первого аспекта содержат белок IL-22, представленный в любой из SEQ ID NO. 16-21. Особенно выгодные производные показаны в таблице 3, проиллюстрированы на фигурах 1-4 и приведены в данном документе в качестве примеров.

ID	Вариации последовательности	SEQ ID NO.	Сайт ковалентного присоединения	Линкер	Жирная кислота
Производное 1	Замена A1C и N-концевой пептид G-P-G	16	1C	γ Glu-OEG-OEG-C ₂ DA-Ac	двухосновная кислота C18
Производное 2	N-концевой пептид 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	двухосновная кислота C18
Производное 3	Замена A1C и N-концевой пептид G-P-G	16	1C	γ Glu-OEG-OEG-C ₂ DA-Ac	двухосновная кислота C16
Производное 4	N-концевой пептид 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	двухосновная кислота C16
Производное 5	Замена A1C и N-концевой пептид G-P-G	16	1C	γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu-	двухосновная кислота C14

				OEG- OEG- ϵ Lys- α Ac	
Производное 6	Замены A1C, N35Q, N64Q и N-концевой пептид G-P-G	18	1C	γ Glu- OEG- OEG- C ₂ DA-Ac	двухосновная кислота C18
Производное 7	Замены A1C, N35Q, N64Q	19	1C	γ Glu- OEG- OEG- C ₂ DA-Ac	двухосновная кислота C18
Производное 8	Замены H6C, N35Q, N64Q и N-концевой пептид G	20	6C	γ Glu- OEG- OEG- C ₂ DA-Ac	двухосновная кислота C18
Производное 9	Замены A33C, N35Q, N64Q	21	33C	γ Glu- OEG- OEG- C ₂ DA-Ac	двухосновная кислота C18
Производное 10	Замены A1C, N35Q, N64Q и N-концевой пептид G-P-G	18	1C	γ Glu- OEG- OEG- C ₂ DA-Ac	двухосновная кислота C16

Таблица 3: Иллюстративные производные IL-22

На фиг. 1А проиллюстрирована двухосновная кислота C18, соединенная с линкером, содержащим Cys-реактивную единицу. Это жирная кислота и линкер (боковая цепь), используемые в производных 1, 2 и 6-9. На фиг. 1В проиллюстрирована двухосновная кислота C16, соединенная с линкером, содержащим Cys-реактивную единицу. Это жирная кислота и линкер (боковая цепь), используемые в производных 3, 4 и 10. На фиг. 1С проиллюстрирована двухосновная кислота C14, соединенная с линкером, содержащим Cys-реактивную единицу. Это жирная кислота и линкер (боковая цепь), используемые в производном 5.

Производные 1, 6 и 10 показаны на фиг. 2-4, соответственно.

Производные по изобретению могут существовать в различных стереоизомерных формах, и изобретение относится ко всем из них.

Согласно второму аспекту изобретения предлагается способ получения производного по первому аспекту, включающий ковалентное присоединение жирной кислоты к белку IL-22. Этот процесс можно использовать для получения любых различных производных IL-22, описанных или предусмотренных в данном документе, но он особенно выгоден, когда жирная кислота ковалентно присоединена к вариантному белку IL-22. Таким образом, в одном варианте осуществления белок IL-22, используемый во втором аспекте, представляет собой замещенную форму hIL-22, необязательно замещенную в положениях 1, 21, 35, 64, 113 и/или 114. Иллюстративные замены включают A1C, A1G, A1H, N21C, N21D, N21Q, N35C, N35D, N35H, N35Q, N64C, N64D, N64Q, N64W, Q113C, Q113R, K114C и/или K114R. Белок IL-22 предпочтительно замещен остатком Cys в положении 1.

Жирную кислоту можно получить любыми способами, известными специалистам, включая рекомбинантные способы. Подходящие жирные кислоты коммерчески доступны или их легко получить из доступных исходных материалов с использованием стандартного химического синтеза.

Белок IL-22 можно получить любыми способами, известными специалистам, включая рекомбинантные способы. Получение рекомбинантного hIL-22 было описано ранее и хорошо известно в данной области. Желаемые варианты белков IL-22 могут быть получены аналогичным образом. Опытный исследователь в данной области без труда сможет идентифицировать подходящие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют желаемые варианты белков IL-22. Таким образом, квалифицированный специалист сможет легко реализовать эту часть изобретения, основываясь на существующих знаниях в данной области техники. Соответственно, белки IL-22 продуцируются в системах млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (СНО), с использованием стандартных способов. Полигистидиновая метка (His-метка) может быть использована для облегчения аффинной очистки рекомбинантных белков.

В связи с этим белки IL-22, используемые в изобретении, могут быть получены с использованием расщепляемой после экспрессии His-метки – N- или C-концевого добавления менее 10, предпочтительно шести, остатков гистидина, которые могут быть очищены с помощью аффинности к никелевой колонке. His-метка связана с N- или C-концом белка через линкер, который может расщепляться известной протеазой с образованием свободного белка IL-22. Расщепляемая His-метка может иметь аминокислотную последовательность HHHHHGGSSSGSGSEVLFQ (SEQ ID NO. 25), а

расщепляемый протеазой линкер может представлять собой линкер вируса травления табака (TEV), чья консенсусная последовательность для нативных сайтов разреза представляет собой ENLYFQ\S. (SEQ ID NO. 26), где '\' обозначает расщепленную пептидную связь или расщепляемый протеазой риновирус-14 3С (HRV14-3С) линкер с консенсусным сайтом расщепления EVLFQ. Расщепление может быть достигнуто путем инкубации примерно 10 мкг протеазы с 2,5 мкг белка и 10 мМ 2-меркаптоэтанола при комнатной температуре в течение 4 часов.

Чтобы дополнительно проиллюстрировать изобретение, представлен следующий репрезентативный способ получения белка. Процесс включает подготовку плазмидной ДНК, которая кодирует желаемую аминокислотную последовательность белка IL-22. Эта плазида может быть временно трансфецирована в клеточную линию, например CHO-K1, которой дают возможность расти в соответствующей среде, прежде чем рост будет усилен добавлением известного энхансера. Затем секретируемый белок IL-22 можно собрать с помощью известных методов центрифугирования и стерильной фильтрации перед очисткой белка на никелевой колонке. После концентрирования и замены буфера His-метку удаляют с помощью протеазы HRV14-3С перед алкилированием жирной кислотой (описано далее ниже) и окончательной очисткой и заменой буфера. Анализ конечного продукта с помощью SDS-PAGE, эксклюзионной хроматографии или жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС-МС) с дегликозилированием или без него можно использовать для обеспечения качества конечного продукта.

Жирная кислота может быть ковалентно присоединена к белку IL-22 либо непосредственно, либо с использованием линкера, как описано для первого аспекта. Линкер может быть получен любым способом, известным в данной области техники. Репрезентативный способ получения жирной кислоты и линкера, если он используется, выглядит следующим образом (на примере двухосновной кислоты C16, используемой в производном 10, но любое производное может быть получено с использованием аналогичного метода).

Раствор N-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимиды (100 г, 401 ммоль) в дихлорметане (500 мл) добавляют к раствору этилендиамина (189 мл, 2,81 моль) в дихлорметане (750 мл). Через 30 минут суспензию фильтруют, промывают и концентрируют *in vacuo*. Остаток разбавляют толуолом (750 мл), промывают и экстрагируют дихлорметаном (4 x 200 мл), сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют, концентрируют *in vacuo* и разбавляют гексаном (200 мл). К раствору добавляют 4 М раствор хлористого водорода в эфире (100 мл, 400 ммоль), полученную суспензию концентрируют *in vacuo* и разбавляют гексаном (1

л). Осажденное твердое вещество фильтруют, промывают гексаном и сушат *in vacuo* с получением гидрохлорида бензилового эфира (2-аминоэтил)карбаминовой кислоты в виде белого порошка.

2-Хлортритиловая смола 100-200 содержит {2-[2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-этокси]-этокси}-уксусную кислоту (Fmoc-Ado-OH, 17,5 г, 45,4 ммоль). Группу Fmoc удаляют и раствор 0-6-хлорбензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторбората (TCTU, 24,2 г, 68,1 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (21,4 мл, 123 ммоль) в N,N-диметилформамиде (140 мл) добавляют к смоле и смесь встряхивают в течение одного часа. Смолу фильтруют и промывают. Группу Fmoc удаляют обработкой 20 % пиперидином, как и ранее. Смолу промывают, как и раньше.

Раствор 1-трет-бутилового эфира (S)-2-(флуорен-9-илметоксикарбониламино)пентандиовой кислоты (Fmoc-Glu-OtBu, 29,0 г, 68,1 ммоль), TCTU (24,2 г, 68,1 ммоль) и к смоле добавляют N,N-диизопропилэтиламин (21,4 мл, 123 ммоль) в N,N-диметилформамиде (140 мл) и смесь встряхивают в течение одного часа. Смолу фильтруют и промывают, как и раньше. Группу Fmoc удаляют обработкой 20 % пиперидином, как и ранее. Смолу промывают, как и раньше.

Раствор 16-трет-бутоксид-16-оксогексадекановой кислоты (23,3 г, 68,1 ммоль), TCTU (24,2 г, 68,1 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (21,4 мл, 123 ммоль) в смеси N,N-диметилформамид/дихлорметан (4:1, 200 мл) добавляют к смоле. Смолу встряхивают в течение часа, фильтруют и промывают N,N-диметилформамидом (3×250 мл), дихлорметаном (2×250 мл), метанолом (2×250 мл) и дихлорметаном (6×250 мл). Продукт отщепляют от смолы обработкой 2,2,2-трифторэтанолом (250 мл) в течение 18 часов. Смолу отфильтровывают и промывают дихлорметаном (2×250 мл), смесью 2-пропанол/дихлорметан (1:1, 2×250 мл), 2-пропанолом (250 мл) и дихлорметаном (3×250 мл).

Растворы объединяют, растворитель выпаривают и неочищенный продукт очищают колоночной флэш-хроматографией. Чистую (S)-22-(трет-бутоксикарбонил)-41,41-диметил-10,19,24,39-тетраоксо-3,6,12,15,40-пентаокса-9,18,23-триазодотетраконтановую кислоту сушат *in vacuo* и получают в виде бледно-желтого густого желтого масла.

Затем добавляют 2-(7-аза-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (HATU, 11,4 г, 30,1 ммоль) и триэтиламин (8,77 мл, 62,9 ммоль) к раствору (S)-22-(трет-бутоксикарбонил)-41,41-диметил-10,19,24,39-тетраоксо-3,6,12,15,40-пентаокса-9,18,23-триазодотетраконтановой кислоты (22,4 г, 27,4 ммоль) в сухом

дихлорметане (110 мл). Триэтиламин (72 мл, 41,0 ммоль) добавляют к суспензии гидрохлорида бензилового эфира (2-аминоэтил)карбаминовой кислоты (6,94 г, 30,1 ммоль) в сухом дихлорметане (165 мл) и полученную смесь добавляют к вышеуказанному решению. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем выпаривают досуха. Остаток повторно растворяют и промывают; сушат над безводным сульфатом натрия и выпаривают на колоночной хроматографии (силикагель 60, 0,040-0,060 мм; элюент: дихлорметан/метанол 95:5) с получением 15-[(S)3-(2-{2-[(2-{2-[(2-бензилоксикарбониламиноэтилкарбамоил)метокси]этокси}этилкарбамоил)метокси]этокси}этилкарбамоил)-1-трет-бутоксикарбонилпропилкарбамоил]пентадекановой кислоты в виде бледно-желтого густого масла.

Палладий-на-угле (10%, 1,27 г, 1,20 ммоль) добавляют к раствору вышеуказанного соединения (23,8 г, 24,0 ммоль) в метаноле (350 мл) и полученную смесь гидрируют при нормальном давлении в течение четырех часов. Катализатор отфильтровывают и фильтрат упаривают досуха. Остаток несколько раз выпаривают из дихлорметана для удаления остатков метанола и сушат *in vacuo*, получая трет-бутил(S)-1-амино-25-трет-бутоксикарбонил)-4,13,22,27-тетраоксо-6,9,15,18-тетраокса-3,12,21,26-тетраазадотетраконтан-42-оат в виде густого бесцветного масла.

N,N-диизопропилэтиламин (4,98 мл, 28,6 ммоль) добавляют к раствору вышеуказанного амина (20,5 г, 23,8 ммоль) в сухом дихлорметане (290 мл) при -30 °С в атмосфере аргона. Добавляют по каплям бромацетилбромид (2,48 мл, 28,6 ммоль) и полученный раствор перемешивают при -30 °С в течение дополнительных трех часов. Охлаждающую баню удаляют, смесь перемешивают при комнатной температуре в течение часа и растворитель удаляют *in vacuo*. Остаток повторно растворяют в этилацетате (450 мл) и промывают 5 %-ным водным раствором лимонной кислоты (300 мл). Фазы разделяются в течение одного часа. Органический слой оставляют разделяться на ночь, получая три фазы. Прозрачный водный слой удаляют, а оставшиеся две фазы встряхивают с насыщенным водным раствором бромида калия (100 мл). Фазы оставляют разделяться на ночь, водную фазу удаляют, а органическую фазу сушат над безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляют *in vacuo* и остаток очищают колоночной флэш-хроматографией: дихлорметан/метанол 95:5) с получением третбутил(S)-1-бром-28-трет-бутоксикарбонил)-2,7,16,25,30-пентаоксо-9,12,18,21-тетраокса-3,6,15,24,29-пентаазапента-тетраконтан-45-оата в виде бесцветного твердого вещества.

Вышеупомянутое соединение (19,5 г, 19,8 ммоль) растворяют в трифторуксусной кислоте (120 мл) и полученный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5

часов. Трифторуксусную кислоту удаляют *in vacuo* и остаток выпаривают из дихлорметана (6 x 200 мл). К маслянистому остатку добавляют диэтиловый эфир (200 мл) и смесь перемешивают в течение ночи с получением суспензии. Твердый продукт фильтруют, промывают диэтиловым эфиром и гексаном и сушат *in vacuo* с получением целевого продукта

15-{{(S)-1-карбокси-3-[2-(2-{{[2-(2-{{[2-(2-Бромацетиламино)этилкарбамоил]метокси}этоксиэтилкарбамоил]метокси}этоксиэтилкарбамоил]пропилкарбамоил}пентадекановой кислоты в виде белого порошка.

Ковалентное присоединение жирной кислоты или линкера к белку IL-22 можно осуществить с использованием стандартных процедур, известных в данной области техники. Таким образом, линкер, если он используется, обеспечивает ковалентное присоединение белка IL-22 к жирной кислоте. В качестве неограничивающего примера, Суs-реактивная жирная кислота или линкер могут реагировать с атомом серы остатка Суs в белке IL-22 с образованием тиоэфирной связи. Подходящие условия для стадии ковалентного присоединения можно проиллюстрировать следующим образом: Трис в воде добавляют к белку IL-22 (70 мг) в Трис и NaCl-буфере (1,35 мг/мл) для доведения pH до 8. Добавляют дикалиевую соль бис(п-сульфонатофенил)фенилфосфина дигидрата (BSPP) (12 мг), растворенного в воде, и осторожно перемешивают в течение четырех часов при комнатной температуре. 15-{{(S)-1-карбокси-3-[2-(2-{{[2-(2-{{[2-(2-бромацетиламино)этилкарбамоил]этокси}этоксиэтилкарбамоил]метокси}этоксиэтилкарбамоил]пропилкарбамоил}пентадекановую кислоту (19 мг, 0,022 ммоль) в этаноле (0,5 мл) добавляли и смесь осторожно перемешивали в течение ночи. Добавляют воду MilliQ (150 мл) для снижения проводимости до 2,5 мСм/см. Затем смесь очищали с помощью анионного обмена на колонке MonoQ 10/100 GL с использованием буфера для связывания (20 mM Трис, pH 8,0), элюирующего буфера (20 mM Трис, 500 mM NaCl, pH 8,0), потока 6 мл и градиента 0–80 % элюирующего буфера на 60 объемов колонки.

Производные по изобретению могут быть очищены с использованием любой подходящей процедуры, известной в данной области техники, такой как хроматография, электрофорез, дифференциальная растворимость или экстракция.

Как описано в данном документе, изобретатели были удивлены, обнаружив, что жирные кислоты могут быть ковалентно присоединены к белку IL-22, сохраняя при этом биологическую активность. Было особенно неожиданно, что такая минимальная модификация IL-22 могла привести к высокой эффективности (близкой к hIL-22) в сочетании с очень длительным периодом полувыведения из кровотока. Это конкретное сочетание свойств может быть весьма желательным.

Активность производных можно определить в анализе *in vitro* с целыми клетками, экспрессирующими рецепторы IL-22 человека. Например, реакцию рецепторов человеческого IL-22 можно измерить, используя клетки почек детенышей хомячка (ВНК), сверхэкспрессирующие IL-22R1, IL-10R2 и репортерный ген, чувствительный к фосфо-STAT3 (pSTAT3). В качестве альтернативы можно использовать клетки HepG2, эндогенно экспрессирующие рецептор IL-22. Активация рецепторов приводит к активации сигнального пути STAT3, что можно измерить, используя репортерный ген люциферазы с STAT3-индуцированным промотором или анализируя, например, pSTAT3. Неограничивающие примеры таких анализов описаны в Примере 2. Активность *in vivo* можно определить на животных моделях или в клинических испытаниях, как известно в данной области.

Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) часто используется в качестве меры эффективности лекарственного средства. Поскольку это представляет собой концентрацию лекарственного средства, необходимую для получения 50 % максимального эффекта, чем ниже значение EC_{50} , тем выше эффективность. Производные по изобретению должным образом обладают активностью (величиной EC_{50}), измеренной с использованием опосредованной рецептором IL-22 активации STAT3 в клетках ниже 1,5 нМ, ниже 1,25 нМ, ниже 1 нМ, ниже 0,75 нМ, ниже 0,5 нМ, ниже 0,25 нМ или даже ниже 0,1 нМ (например, определено, как описано в примере 2). Производные по изобретению соответствующим образом обладают активностью (значение EC_{50}), измеренной путем анализа pSTAT3 в клетках ниже 15 нМ, ниже 12 нМ, ниже 10 нМ, ниже 7 нМ или даже ниже 5 нМ (например, определено, как описано в примере 2).

Преимущественно активность производных IL-22 может быть выше, чем у гибридов IL-22-Fc. Например, Genentech сообщила о 34-кратном снижении активности *in vitro* своего гибрида IL-22-Fc, UTTR1147A, по сравнению с hIL-22 (Stefanich *et al.*, *Biochem Pharmacol*, 2018, 152:224-235). Напротив, было показано, что ковалентное присоединение жирной кислоты к hIL-22 вызывает только семикратное снижение активности (см. производное 1 в примерах). Хотя гибриды IL-22-Fc и производные по данному изобретению могут быть сопоставимы с точки зрения их улучшенного периода полувыведения по сравнению с hIL-22 и биологической функции, по меньшей мере, в некоторых условиях, производные по данному изобретению могут иметь дополнительное преимущество минимальной потери активности.

Период полувыведения из кровотока ($T_{1/2}$) производных можно определить *in vivo* путем введения производных подкожно или внутривенно на подходящей животной модели, такой

как мышь, крыса или минипиг. Подходящие способы описаны в Примере 1. В качестве неограничивающего примера, производные первого аспекта имеют период полувыведения из кровотока после подкожного или внутривенного введения мышам по меньшей мере один час, по меньшей мере три часа, по меньшей мере пять часов или даже по меньшей мере восемь часов. Производные могут иметь период полувыведения из кровотока после подкожного или внутривенного введения крысам, составляющий по меньшей мере три часа, по меньшей мере пять часов, по меньшей мере восемь часов, по меньшей мере 10 часов или даже по меньшей мере 13 часов. Производные могут иметь период полувыведения из кровотока после подкожного или внутривенного введения минипигам, составляющий по меньшей мере 25 часов, по меньшей мере 40 часов, по меньшей мере 70 часов или даже по меньшей мере 100 часов (все определено, например, как описано в примере 1).

Как показано в данном документе, изобретатели также обнаружили, что производные по изобретению быстро всасываются *in vivo*. Преимущественно, абсорбция производных может происходить быстрее, чем абсорбция гибридов IL-22-Fc. Среднее время абсорбции является точным параметром для измерения поглощения, поскольку оно не зависит от дозы и максимальной концентрации в плазме крови после введения лекарственного средства. Его можно рассчитать на основе среднего времени пребывания, то есть времени, которое лекарственное средство проводит в организме до выведения после завершения всасывания. Производные по изобретению соответственно имеют среднее время абсорбции менее 100 ч, менее 90 ч, менее 80 ч, менее 70 ч или даже менее 60 ч (например, определенное, как описано в примере 1).

Производные по изобретению также обладают хорошими биофизическими свойствами, такими как высокая физическая стабильность и/или растворимость, которые могут быть измерены с использованием стандартных методов в данной области техники.

Таким образом, согласно третьему аспекту изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая производное первого аспекта и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтическая композиция третьего аспекта может содержать любое из различных производных IL-22, описанных или предусмотренных в данном документе. Соответственно, она содержит одно из производных IL-22, обозначенных в данном документе как производное 1-10.

Производное первого аспекта или фармацевтическая композиция третьего аспекта должным образом будут демонстрировать увеличенный период полувыведения из кровотока по сравнению с hIL-22. Преимущественно они будут демонстрировать

увеличенный период полувыведения из кровотока по сравнению с hPL-22 по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 100 % или более.

Фармацевтические композиции третьего аспекта могут быть приготовлены путем объединения терапевтически эффективного количества производного первого аспекта с фармацевтически приемлемым носителем. Состав фармацевтически активных ингредиентов с различными эксципиентами известен в данной области техники.

«Терапевтически эффективное количество» производного по первому аспекту представляет собой любое количество, которое при введении субъекту представляет собой количество производного, необходимое для лечения заболевания, расстройства или состояния или для получения желаемого эффекта.

Например, терапевтически эффективное количество используемого производного может составлять от около 0,001 мг до около 1000 мг и предпочтительно от около 0,01 мг до около 500 мг. Предпочтительно, чтобы количество производного составляло от около 0,1 мг до около 100 мг и наиболее предпочтительно от около 0,5 мг до около 50 мг. В качестве ориентира доза производного, использованная у мышей в примере 3, описанном в данном документе, составляла 0,5 мг/кг (вводимая подкожно).

«Фармацевтически приемлемый носитель», как упоминается в данном документе, представляет собой любое известное соединение или комбинацию известных соединений, которые известны специалистам в данной области как полезные при составлении фармацевтических композиций.

В одном варианте осуществления фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой твердое вещество, необязательно, композиция может находиться в форме порошка для ресуспендирования. Твердый фармацевтически приемлемый носитель может включать одно или более веществ, которые могут также действовать как ароматизирующие агенты, смазывающие вещества, солюбилизаторы, суспендирующие агенты, красители, наполнители, скользящие вещества, инертные связующие вещества, консерванты или красители. Носитель также может представлять собой герметизирующий материал. В порошках носитель представляет собой мелкоизмельченное твердое вещество, которое находится в смеси с тонкоизмельченными производными согласно изобретению. Порошки предпочтительно содержат до 99 % производного. Подходящие твердые носители включают, например, фосфат кальция, стеарат магния, тальк, сахара, лактозу, декстрин, крахмал, желатин, целлюлозу и ионообменные смолы.

В другом варианте осуществления фармацевтический носитель может быть гелем, а композиция может быть в форме крема или тому подобного.

Однако фармацевтический носитель может быть жидкостью; необязательно фармацевтическая композиция находится в форме раствора. Жидкие носители используют для приготовления растворов, суспензий, эмульсий, сиропов, эликсиров и композиций под давлением. Производное по изобретению может быть растворено или суспендировано в фармацевтически приемлемом жидком носителе, таком как вода, органический растворитель, смесь обоих или фармацевтически приемлемые масла или жиры. Жидкий носитель может содержать другие подходящие фармацевтические добавки, такие как солюбилизаторы, эмульгаторы, буферы, консерванты, подсластители, ароматизаторы, суспендирующие агенты, загущающие агенты, красители, регуляторы вязкости, стабилизатор или осмотические регуляторы. Подходящие примеры жидких носителей для парентерального введения включают воду (частично содержащую добавки, как указано выше, например, производные целлюлозы, предпочтительно раствор натрия карбоксиметилцеллюлозы), спирты (включая одноатомные спирты и многоатомные спирты, например, гликоли) и их производные, а также масла (например, фракционированное кокосовое масло и арахисовое масло). Для парентерального введения носитель также может представлять собой маслянистый эфир, такой как этилолеат и изопропилмиристат. Стерильные жидкие носители применимы в стерильных жидких композициях для парентерального введения. Жидкий носитель для композиций под давлением может быть галогенированным углеводородом или другим фармацевтически приемлемым пропеллентом.

Таким образом, способ получения фармацевтической композиции по изобретению может включать обычные этапы, которые являются стандартными в данной области техники.

Таким образом, в соответствии с четвертым аспектом изобретения предлагается производное первого аспекта или фармацевтическая композиция третьего аспекта для применения в терапии. Также предложен способ лечения субъекта производным по изобретению или фармацевтической композицией, содержащей его. Любые из различных производных П-22, описанных или предусмотренных в данном документе, прямо включены в эти аспекты изобретения.

Такие термины, как «лечение» и «терапия», используемые в данном документе, явно включают лечение, облегчение или предотвращение заболевания, расстройства или состояния.

Производное П-22 или содержащую его фармацевтическую композицию можно вводить непосредственно субъекту, подлежащему лечению. Производное или фармацевтическую композицию можно вводить любым способом, включая ингаляцию, инъекцию, местно или

в глаз. Ингаляцию можно осуществлять через нос или рот. Предпочтительно производное или фармацевтическую композицию вводят путем инъекции, обычно подкожно или внутривенно. Таким образом, производные имеют явное преимущество перед гибридами с Fc в гибкости введения (например, путем инъекции, ингаляции, местного применения или введения в глаз) из-за их меньшего размера и более высокой активности. Следует понимать, что введение субъекту, подлежащему лечению, производного по изобретению приведет к увеличению времени циркуляции по сравнению с hIL-22, и что это будет способствовать лечению заболевания, расстройства или состояния. Как указано выше, «лечение» также включает облегчение и предотвращение заболевания, расстройства или состояния.

Жидкие фармацевтические композиции, представляющие собой стерильные растворы или суспензии, можно использовать, например, путем внутримышечной, подоболочечной, эпидуральной, внутрибрюшинной и особенно подкожной или внутривенной инъекции. Производное может быть приготовлено в виде стерильной твердой композиции, которую можно растворять или суспендировать во время введения с использованием стерильной воды, физиологического раствора или другой подходящей стерильной среды для инъекций. Формы, пригодные для ингаляции, включают стерильные растворы, эмульсии и суспензии. В качестве альтернативы производные можно вводить в виде мелкодисперсного порошка или аэрозоля через Dischaler® или Turbohaler®. Назальные ингаляции могут быть в форме мелкодисперсного порошка или аэрозольного назального спрея или модифицированного Dischaler® или Turbohaler®.

Препараты для местного применения включают растворы, кремы, пены, гели, лосьоны, мази, пасты, настойки и порошки. Они могут быть нанесены на кожу, т.е. наноситься непосредственно на кожу, или наноситься на слизистые оболочки.

Препараты для глазного введения обычно представляют собой растворы, суспензии и мази для местного применения, например в виде глазных капель. В качестве альтернативы можно использовать стерильные растворы или суспензии путем внутриглазной инъекции. Производное может быть приготовлено в виде стерильной твердой композиции, которую можно растворять или суспендировать во время введения с использованием стерильной воды, физиологического раствора или другой подходящей стерильной среды для инъекций. Композиция может быть предназначена для субконъюнктивной, интравитреальной, ретробульбарной или внутрикамерной инъекции.

Производное или фармацевтическая композиция по изобретению может быть введена любому нуждающемуся в этом субъекту. «Субъект», используемый в данном документе,

может быть позвоночным, млекопитающим или домашним животным. Следовательно, производные и композиции по изобретению могут быть использованы для лечения любого млекопитающего, например домашнего скота (например, лошади), домашних животных, или могут быть использованы в других ветеринарных целях. Наиболее предпочтительно субъектом является человек. Производные и композиции необходимо вводить не только тем, у кого уже проявляются признаки заболевания, расстройства или состояния. Скорее их можно вводить внешне здоровым субъектам в качестве чисто профилактической меры против возможности такого заболевания, расстройства или состояния в будущем.

Следует понимать, что производные П-22 и композиции по изобретению можно использовать в монотерапии (т.е. при единственном применении этого производного или композиции) для лечения заболевания, расстройства или состояния. Альтернативно, производные и композиции по изобретению можно использовать в качестве дополнения или в сочетании с известными терапевтическими средствами для лечения заболевания, расстройства или состояния.

Следует понимать, что необходимое количество производного П-22 определяется его биологической активностью, периодом полувыведения и биодоступностью, что, в свою очередь, зависит от способа введения, физико-химических свойств производного и состава, а также независимо от того, используется ли он в качестве монотерапии или в составе комбинированной терапии. На частоту введения также будет влиять период полувыведения производного у субъекта, которого лечат. Оптимальные дозы для введения могут быть определены специалистами в данной области и будут варьировать в зависимости от конкретного используемого производного, силы фармацевтической композиции, способа введения и прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. Дополнительные факторы, зависящие от конкретного субъекта, которого лечат, приведут к необходимости корректировки дозировок, включая возраст субъекта, массу, пол, диету и время введения. Как правило, суточная доза от 0,001 мкг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела производного П-22 по изобретению может быть использована для лечения заболевания, расстройства или состояния, в зависимости от того, какое производное или композиция используется. Более предпочтительно суточная доза составляет от 0,01 мкг/кг массы тела до 1 мг/кг массы тела, более предпочтительно от 0,1 мкг/кг до 500 мкг/кг массы тела и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,1 мкг/кг до 100 мкг/кг массы тела.

Производное П-22 или композицию можно вводить до, во время или после начала заболевания, расстройства или состояния. Ежедневные дозы можно вводить в виде однократного введения (например, однократной ежедневной инъекции). Альтернативно,

производное или композиция могут потребовать введения два или более раз в течение дня. Например, производные можно вводить в виде двух (или более, в зависимости от тяжести заболевания, расстройства или состояния, которое лечат) суточных доз от 0,07 мкг до 700 мг (т.е. при массе тела 70 кг). Пациент, получающий лечение, может принять первую дозу после пробуждения, а затем вторую дозу вечером (при двухдозовом режиме) или после этого с 3- или 4-часовыми интервалами. В качестве альтернативы дозы можно вводить один раз в неделю, каждые две недели или один раз в месяц или чаще, например, два или три раза в неделю. Известные процедуры, такие как те, которые обычно используются в фармацевтической промышленности (например, эксперименты *in vivo*, клинические испытания и т. д.), могут быть использованы для получения конкретных составов производных и композиций по изобретению и точных терапевтических режимов (таких как суточные дозы препаратов и кратность введения).

Многие исследования продемонстрировали ключевые эффекты IL-22 на множественных моделях повреждения эпителия, особенно в легких, печени, кишечнике, почках, коже, поджелудочной железе и тимусе. Механически, несколько путей внутри, например, антиапоптоз, пролиферация, врожденный иммунитет, антиокислительный стресс, антифиброз и рекрутирование стволовых клеток/клеток-предшественников хорошо задокументированы как медиаторы эффектов IL-22 в исследованиях, проведенных несколькими исследователями. Ключевые механистические открытия были дополнительно подтверждены *in vitro* с использованием клеточных линий человека или в моделях человека *ex vivo* (например, первичные кишечные органоиды человека). Таким образом, хорошо известна сильная роль IL-22 в предотвращении гибели клеток, обеспечении регенерации и контроле воспаления при повреждении эпителия.

Многие исследования проводятся путем анализа генетических моделей (нокаут IL-22 или трансгенная сверхэкспрессия), подвергшихся повреждению. В этих исследованиях отсутствие IL-22 или избыточная экспрессия IL-22 будут иметь место во время поражения. В других исследованиях IL-22 нейтрализуется антителами во время повреждения, а в некоторых случаях IL-22 нейтрализуется после острой фазы повреждения (например, в подострой или глубокой фазе регенерации). Другие исследования приближаются к сценарию лечения, рассматривая эффекты экзогенно введенного IL-22. При комплексном рассмотрении доступной литературы важно отметить, что различные модели, будь то нокаут, сверхэкспрессия, нейтрализация IL-22 до или после поражения или дозирование экзогенного белка, рисуют одну и ту же картину IL-22, защищающего поврежденные органы и управляющего регенерацией. Это указывает на широкое применение и широкое

временное окно лечебного потенциала ПЛ-22, а также показывает, почему требуется белок ПЛ-22 более длительного действия, чем hPL-22.

Таким образом, в соответствии с пятым аспектом изобретения предложено производное первого аспекта, или фармацевтическая композиция третьего аспекта для применения в способе лечения метаболического, печеночного, легочного, кишечного, почечного или кожного заболевания, расстройства или состояния. Любые из различных производных ПЛ-22, описанных или предусмотренных в данном документе, прямо включены в этот аспект изобретения.

Метаболическое заболевание, расстройство или состояние могут представлять собой ожирение, диабет 1 типа, диабет 2 типа, гиперлипидемию, гипергликемию или гиперинсулинемию.

Заболевание, расстройство или состояние печени может представлять собой НАЖБП, НАСГ, цирроз, алкогольный гепатит, острую печеночную недостаточность, хроническую печеночную недостаточность, ACLF, индуцированную ацетаминофеном гепатотоксичность, острое повреждение печени, склерозирующий холангит, билиарный цирроз или патологическое состояние, вызванное хирургическим вмешательством или трансплантацией.

Легочное заболевание, расстройство или состояние может представлять собой ХОБЛ, кистозный фиброз, бронхоэктазы, идиопатический легочный фиброз, острый респираторный дистресс-синдром, химическое повреждение, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию или грибковую инфекцию.

Заболевание, расстройство или состояние кишечника могут быть ВЗК, язвенным колитом, болезнью Крона, РТПХ, химическим повреждением, вирусной инфекцией или бактериальной инфекцией.

Заболевание почек, расстройство или состояние может быть острым заболеванием почек или хроническим заболеванием почек.

Кожное заболевание, расстройство или состояние может быть раной, воспалительным заболеванием или БТПХ.

Также предложен способ лечения субъекта, имеющего состояние, поддающееся лечению ПЛ-22, такое как одно или более из вышеперечисленных заболеваний, нарушений или состояний, производным ПЛ-22 или фармацевтической композицией, содержащей его.

Производное ПЛ-22 обладает всеми признаками, указанными для первого аспекта изобретения. Фармацевтическая композиция обладает всеми признаками, указанными для третьего аспекта изобретения. Способ лечения субъекта, имеющего состояние,

поддающееся лечению IL-22, такое как одно или более из вышеуказанных заболеваний, нарушений или состояний, обладает всеми признаками, указанными для четвертого аспекта изобретения.

Нет ограничений на то, какое производное IL-22 или композицию, описанные в данном документе, следует вводить такому пациенту. Скорее предполагается, что любое из описанных в данном документе производных и композиций можно вводить любому пациенту, как описано в данном документе.

Все признаки, описанные в данном документе (включая любой пункт прилагаемой формулы изобретения, реферат и графические материалы), и/или все этапы любого раскрытого таким образом способа, могут быть объединены с любым из вышеупомянутых аспектов в любой комбинации, за исключением комбинаций, где по меньшей мере некоторые из таких признаков и/или этапов являются взаимоисключающими.

Для лучшего понимания изобретения и демонстрации того, как его варианты осуществления могут быть реализованы, далее будет сделана ссылка на примеры, которые никоим образом не предназначены для ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

Материалы и методы, использованные в исследованиях, описанных в примерах, были следующими, если не указано иное.

Производные

В таблице 4 представлен обзор производных IL-22 и компараторов, представленных в наборах данных.

Производные IL-22 имели различные каркасы, типы жирных кислот и места ковалентного присоединения и, таким образом, представляли разнообразие производных, охватываемых изобретением. Во всех случаях использовался линкер γ Glu-OEG-OEG-C₂DA-Ac. Во всех случаях линкер был присоединен к остатку 1C, за исключением производных 2 (-7C), 4 (-7C), 8 (6C) и 9 (33C). В то время как производное 7 иллюстрирует ковалентное присоединение к 1C, в нем отсутствует N-концевой пептид G-P-G, присутствующий во всех других производных, которые имеют жирную кислоту, ковалентно присоединенную к 1C. Препаратами сравнения были hIL-22, hFc-hIL-22 (рекомбинантный слитый белок) и варианты hIL-22 (т.е. hIL-22, имеющий только одну или несколько вариаций каркаса).

ID	SEQ ID NO. (для белка IL-22)	Вариации каркаса	Жирная кислота или другой протактор
----	------------------------------	------------------	-------------------------------------

hIL-22	SEQ ID NO. 1	Отсутствует	Отсутствует
hFc-hIL-22	SEQ ID NO. 1	Отсутствует	Fc
Компаратор 1	SEQ ID NO. 22	A1G	Отсутствует
Компаратор 2	SEQ ID NO. 23	A1G, N21D, N35D, N64D	Отсутствует
Компаратор 3	SEQ ID NO. 24	A1G, N35Q, N64Q	Отсутствует
Компаратор 4	SEQ ID NO. 16	N-концевой пептид G- P-G, A1C	Отсутствует
Компаратор 5	SEQ ID NO. 18	N-концевой пептид G- P-G, A1C, N35Q, N64Q	Отсутствует
Производное 1	SEQ ID NO. 16	N-концевой пептид G- P-G, A1C	двухосновная кислота C18
Производное 2	SEQ ID NO. 17	N-концевой пептид G- P-G-S-G-S-G-S-C-G- S-G-S-G-S	двухосновная кислота C18
Производное 3	SEQ ID NO. 16	N-концевой пептид G- P-G, A1C	двухосновная кислота C16
Производное 4	SEQ ID NO. 17	N-концевой пептид G- P-G-S-G-S-G-S-C-G- S-G-S-G-S	двухосновная кислота C16
Производное 6	SEQ ID NO. 18	N-концевой пептид G- P-G, A1C, N35Q, N64Q	двухосновная кислота C18
Производное 7	SEQ ID NO. 19	A1C, N35Q, N64Q	двухосновная кислота C18
Производное 8	SEQ ID NO. 20	N-концевой пептид G, H6C, N35Q, N64Q	двухосновная кислота C18
Производное 9	SEQ ID NO. 21	A33C, N35Q, N64Q	двухосновная кислота C18
Производное 10	SEQ ID NO. 18	N-концевой пептид G- P-G, A1C, N35Q, N64Q	двухосновная кислота C16

Таблица 4: Обзор ключевых производных и компараторов, представленных в наборах данных

Анализ контроля качества производных, полученных для примеров, проводили следующим образом.

Интактную массу белков определяли в постдегликозилированном образце путем добавления 20 мкл образца с концентрацией 1 мг/мл к 2 мкл N-гликозидазы F при комнатной температуре в течение 48 часов. Затем образцы разбавляли до 0,2 мг/мл PBS при pH 7,4 и анализировали с помощью Synapt G2, соединенного с Waters Synapt G2, с Waters MassLynx 4.1. Использовали 10-90 колонку Acquity UPLC Protein BEH C4 1,7 мкм 1×100 мм со следующими подвижными фазами: А: 0,1% муравьиная кислота в воде; и В: ацетонитрил, 0,09% муравьиная кислота. Скорость потока составляла 120 мкл/мин, УФ 214 нм (20 точек/с), а градиент соответствовал показанному в таблице 5.

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	%А
Исходный уровень	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

Таблица 5: Градиент (% и мин), используемый для контроля качества производных

IL-22

Результаты показаны в Таблице 6.

ИД	Дегликозилированная теоретическая масса (Да)	Наблюдаемая дегликозилированная масса (Да)	Время удерживания (мин)
Производное 1	17807,6	17807,0	13,81
Производное 3	17779,6	17778,5	11,68
Производное 4	18658,4	18657,5	7,11
Производное 5	18225,0	18224,0	7,28
Производное 6	17832,7	17832,0	7,40

Таблица 6: Масса и время удерживания, наблюдаемые для ключевых производных IL-22

Таким образом, данные контроля качества подтвердили, что предполагаемые производные действительно были получены.

Ниже приведены примеры протоколов, предназначенные только для иллюстрации заявленного изобретения. Точное количество животных и временные промежутки, использованные в исследованиях, могут варьировать, как должно быть известно специалисту в данной области.

Пример 1 – Фармакокинетическое исследование

Методы

Фармакокинетические исследования выбранных производных проводились на мышах (n=27), крысах (n=4-8) и минипигах (n=2-5). Производные IL-22 тестировали вместе с вариантами hIL-22, hFc-hIL-22 и/или hIL-22 в качестве компараторов.

(i) Мыши и крысы

30 самцов мышей C57Bl/6 в возрасте 8 недель и пять самцов крыс Спрег-Доули были получены от Taconic Biosciences. Мышей содержали группами по 10 особей. Животных акклиматизировали в течение одной недели до экспериментов. Массу тела измеряли до введения дозы, что важно для фармакокинетических расчетов. В течение всего эксперимента животные бодрствовали, имели доступ к пище и воде.

Все производные и компараторы готовили в виде растворов 0,3 мг/мл в PBS, pH 7,4, для применения на мышах и растворов 0,5 мг/мл, для применения на крысах. Дозу 2,0 мг/кг испытывали на мышах. Дозу 1 мг/кг испытывали на крысах.

Производные и компараторы вводили животным подкожно. Образцы крови брали в определенные моменты времени после введения дозы.

У мышей использовали разреженные образцы; таким образом, 27 мышам вводили производное PL-22 или компаратор, и образцы крови брали у трех разных мышей в каждый из следующих моментов времени: 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 60 мин, 75 мин, 90 мин, 105 мин, 120 мин, 150 мин, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 16 ч, 24 ч, 32 ч и 48 ч. Таким образом, в ходе исследования у каждой мыши было взято всего два образца. После взятия последней пробы мышей подвергали эвтаназии путем смещения шейных позвонков.

Пяти крысам вводили производное PL-22 или компаратор и брали по три образца крови в каждый из следующих моментов времени: 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 60 мин, 75 мин, 90 мин, 105 мин, 120 мин, 150 мин, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч. У каждой крысы было взято 17 образцов в ходе исследования. После взятия последней пробы крыс усыпляли углекислым газом.

Образцы крови (100 мкл) брали у мышей и крыс из языка и переносили в пробирки с ЭДТА (Microvette® VetMed 200 K3E, Sarstedt nr 09.1293.100). Кровь центрифугировали в течение 5 минут при 8000 G, 4 °C в течение 20 минут после забора. Образцы плазмы (40-50 мкл) переносили в полумикронные пробирки.

(ii) Минипиги

Геттингенские минипиги в возрасте 9 месяцев с массой тела около 15 кг были получены от Ellegaard Göttingen Minipigs A/S. Перед операцией (установка катетеров) был разрешен период акклиматизации продолжительностью примерно 18 дней, в течение которого минипигов социализировали и обучали подкожному дозированию и забору крови из катетера. За три-пять дней до операции минипигов содержали в одиночном помещении. За шесть дней до введения дозы всем минипигам устанавливали два центральных венозных катетера (Cook Medical, C-TPNS-6.5-90-REDO, силикон, размер 6,5 полихлорвиниловое волокно, длина 106 см, тип TPN), что обеспечивало время восстановления после операции не менее пяти дней до начала исследования (дозирования).

Все производные и компараторы готовили в виде растворов в PBS, pH 7,4. Используемые дозы составляли 0,1 мг/кг (внутривенно) или 0,2 мг/кг (подкожно).

Минипигов слегка анестезировали пропофолом во время введения дозы. Внутривенные инъекции вводили минипигам через длинный центральный катетер. После введения

катетер промывали 10 мл стерильного физиологического раствора. Подкожную инъекцию делали на глубину 5 мм с помощью иглы 25G. Игла оставалась в коже в течение 10 с после инъекции, чтобы избежать обратного потока.

Образцы крови брали у минипигов в следующие моменты времени после внутривенного введения: 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 24 ч, 28 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 144 ч, 168 ч, 192 ч, 216 ч, 240 ч, 264 ч, 312 ч, 336 ч, 360 ч, 384 ч, 408 ч, 432 ч и 480 ч. Образцы крови брали в следующие моменты времени после подкожного введения: 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 14 ч, 16 ч, 18 ч, 20 ч, 22 ч, 24 ч, 26 ч, 28 ч, 46 ч, 52 ч, 72 ч, 96 ч, 144 ч, 168 ч, 192 ч, 216 ч, 240 ч, 264 ч, 312 ч, 336 ч, 360 ч, 384 ч, 408 ч, 432 ч и 480 ч.

Образцы крови (1 мл) собирали у минипигов в пробирки с ЭДТА (пробирка на 1,3 мл, содержащая КЗЭДТА, чтобы получить 1,6 мг КЗЭДТА/мл крови (Sarstedt, Германия)). Образцы выдерживали на влажном льду не более 30 мин до центрифугирования (10 мин, 4 °С, 2000 G). 200 мкл плазмы переносили в пробирки Micronic для измерения производных IL-22 или препаратов сравнения и хранили при -20 °С до проведения анализа.

(iii) Обработка образцов

Уровни производных IL-22 или компараторов в плазме измеряли с использованием собственных разработанных анализов люминесцентного кислородного канала (LOCI[®]), как описано ранее (Poulsen *et al.* *J Biomol Screen*, 2007, 12(2):240-7). Во время анализов был создан зависящий от концентрации гранула-аналит-иммунный комплекс, что привело к светоотдаче, которая была измерена на ридере Perkin Elmer Envision. Связывание антител с гранулами, биотинилирование антител и процедуру анализа LOCI выполняли, как описано ранее (Petersen *et al.*, *J Pharmaceut Biomed*, 2010, 51(1):217-24). Калибраторы и образцы для контроля качества (КК) были изготовлены в той же матрице, что и образцы для исследования. Точность анализа (%CV) была оценена и оказалась ниже 20 % для всех протестированных образцов.

В анализе использовались акцепторные гранулы, конъюгированные с моноклональным антителом против человеческого IL-22 (R&D Systems MAB7822), вместе с биотинилированным моноклональным антителом (R&D Systems BAF7821; индуцированное против человеческого IL-22) и общие донорные гранулы, покрытые стрептавидином. Нижний предел количественного определения (НПКО) человеческого IL-22 в плазме крыс составлял 4 пМ. Однако каждая производная или компаратор измерялась в сравнении с рядом калибраторов той же производной. Измеряли перекрестную реактивность каждого производного или компаратора против hIL-22 и использовали для корректировки чувствительности анализа.

Профили зависимости концентрации в плазме от времени измеряли для минипигов с использованием некомпартментного анализа (NCA) в программе Phoenix WinNonlin Professional 6.4 (Pharsight Inc). Расчеты проводились с использованием индивидуальных концентраций, взвешиванием по $1/(Y*Y)$ и с использованием линейного логарифмического трапецеидального. Внутривенное введение было использовано, поскольку период полувыведения из кровотока ($T_{1/2}$) был основным скрининговым параметром. Клиренс и объем распределения были второстепенными интересующими параметрами, что и послужило причиной частого взятия образцов крови в течение 1-го дня исследования.

Единственным параметром, измеряемым для оценки фармакокинетики у мышей и крыс, был период полувыведения из кровотока ($T_{1/2}$). У минипигов измеряли дополнительные параметры: максимальная (пиковая) концентрация в плазме после введения препарата (C_{max}), время достижения C_{max} (T_{max}), площадь под кривой зависимости концентрации препарата в плазме от времени (AUC; которая отражает фактическое воздействие препарата на организм после введения дозы лекарственного средства), нормированное для дозы лекарственного средства (AUC/D), среднее время пребывания (MRT; т. е. время, которое лекарственное средство находится в организме до элиминации после завершения абсорбции), среднее время абсорбции (MAT) и системная доступность введенной дозы (т.е. биодоступность; F). MAT рассчитывается как MRT после подкожного введения (MRT_{sc}) минус MRT после внутривенного введения. (MRT_{IV}).

Результаты

В таблице 7 показаны результаты, полученные на мышах, в таблице 8 представлены результаты, полученные на крысах, а в таблицах 9 и 10 показаны результаты, полученные на минипигах. НО = не определено. в/в = внутривенное введение. п/к = подкожное введение.

ID	Путь введения	T _{1/2} (ч)
hFc-hIL-22	в/в	НО
	п/к	30,0
Компаратор 1	в/в	0,4
	п/к	1,4
Компаратор 3	в/в	0,4
	п/к	0,7
Производное 1	в/в	6,0
	п/к	8,3
Производное 6	в/в	6,6
	п/к	9,1

Таблица 7: Фармакокинетические данные, полученные на мышах

Как показано в таблице 7, варианты hIL-22, имеющие только вариации каркаса (компараторы 1 и 3), имели короткий период полувыведения из кровотока независимо от пути введения. Протракция со слиянием Fc (hFc-hIL-22) значительно увеличивала время полужизни. Ковалентное присоединение жирной кислоты (двухосновная кислота C18; производные 1 и 6) приводило к промежуточному периоду полувыведения из кровотока у мышей. Производные IL-22 дольше циркулировали у мышей при подкожном введении по сравнению с внутривенным введением.

ID	Путь введения	T _{1/2} (ч)
Компаратор 1	в/в	0,2
	п/к	НО
Производное 1	в/в	11,1
	п/к	10,9
Производное 3	в/в	4,3
	п/к	9,7
Производное 6	в/в	10,8
	п/к	12,3

Таблица 8: Фармакокинетические данные, полученные на крысах

Как показано в Таблице 8, вариант hIL-22, имеющий только вариацию каркаса (компаратор 1), имел короткий период полувыведения из кровотока. Ковалентное присоединение жирной кислоты (производные 1, 3 и 6) приводило к увеличению периода полувыведения из кровотока у крыс, независимо от используемой жирной кислоты (C16 по сравнению с

С18 двухосновной кислотой) и способа введения. Производные IL-22 обычно циркулируют дольше при подкожном введении по сравнению с внутривенным.

ID	Путь введения	T _{1/2} (ч)
hIL-22	в/в	4,6
	п/к	6,6
hFc-hIL-22	в/в	65,4
	п/к	141,0
Компаратор 1	в/в	3,9
	п/к	8,7
Компаратор 2	в/в	3,5
	п/к	3,7
Производное 1	в/в	53,9
	п/к	НО
Производное 6	в/в	66,5
	п/к	106,0
Производное 10	в/в	НО
	п/к	40,0

Таблица 9: Фармакокинетические данные, полученные на минипигах

Как показано в таблице 9, варианты hIL-22, имеющие только вариации каркаса (компараторы 1 и 2), имели короткий период полувыведения из кровотока, сравнимый с hIL-22. Слитый с Fc компаратор (hFc-hIL-22) и все производные IL-22 (производные 1, 6 и 10) имели значительно увеличенный период полувыведения из кровотока. Производные IL-22 имели период полувыведения из кровотока более 50 часов у минипиггов при внутривенном введении, что было на одном уровне со слитым с Fc компаратором IL-22.

ID	Путь введения	C _{max} (нмоль/л)	T _{max} (ч)	AUC/D (ч*кг*пмоль/ л/пмоль)	MRT (ч)	MAT (ч)	F (%)
hFc-hIL-22	в/в	56,0	0,05	407	91,7	НО	НО
	п/к	14,8	5,00	365	192,0	100	89,7
Производное 6	в/в	98,9	0,05	551	85,6	НО	НО
	п/к	37,6	8,00	399	146	60,3	72,4

Таблица 10: Фармакокинетические данные, полученные на минипигах

Как показано в Таблице 10, для производного IL-22 (производное 6) было продемонстрировано более быстрое МАТ по сравнению со слитым с Fc компаратором (hFc-

IL-22). МАТ является более точным показателем усвоения лекарственного средства, чем простое сравнение T_{max} , поскольку оно также учитывает различия в C_{max} (T_{max} зависит как от дозы, так и от C_{max}). Для этого исследования использовались минипиги, а не мыши или крысы, из-за их сходства с людьми.

Заключение

Известное производное GLP-1, алкилированное жирными кислотами, семаглутид, имеет период полувыведения 46 часов у минипигов (Lau *et al.*, *J Med Chem*, 2015, 58(18):7370-80) и период полувыведения 160 часов у человека, что соответствует профилю дозирования один раз в неделю с отношением пика к минимуму, равным 2. Период полувыведения слитого с Fc производного GLP-1, дулаглутида, аналогичен.

Предполагается, что период полувыведения производных IL-22 у минипигов составляет не менее 40 часов при подкожном введении и более 50 часов при внутривенном введении, поэтому предполагается, что он соответствует профилю дозирования один раз в неделю у человека с соотношением пикового и минимального уровня, равным 2.

Таким образом, данные показывают, что производные по изобретению увеличивают период полувыведения IL-22 из кровотока и демонстрируют оптимизированные фармакокинетические и фармакодинамические свойства, предлагая, таким образом, новое и улучшенное лечение широкого спектра показаний, включая заболевания, нарушения и состояния метаболизма, почек, легких, кишечника, надпочечников, глаз, тимуса, поджелудочной железы и кожи.

Пример 2 – Исследование активности *in vitro*

Методы

Два анализа *in vitro* были использованы для изучения активности.

Первым был анализ репортерного гена в клетках ВНК, которые были трижды трансфицированы IL-22Ra, IL-10Rb и люциферазой с STAT3-индуцированным промотором. Это высокочувствительный анализ с высокой пропускной способностью, который измеряет активацию STAT3, опосредованную рецептором IL-22.

Стабильная репортерная клеточная линия ВНК была получена с использованием следующих плазмид: (i) hIL-10Rb в pcDNA3,1hygro(+), (ii) IL22R в pcDNA3,1(Zeocin) и (iii) 2xKZdel2 в pGL4.20. Таким образом, клеточная линия экспрессировала человеческий IL-10Rb, человеческий IL-22Ra и репортер люциферазы под контролем промотора, управляемого pSTAT3.

В день 0 протокола анализа клетки высевали в базальную среду (на 500 мл: DMEM + GlutaMax (Gibco, кат. №: 31966-021), 10 % (мас/об) фетальной телячьей сыворотки, (FCS;

содержит альбумин) (50 мкл) и 1 % (масс./об.) пенициллин-стрептомицина (P/S) (5 мкл) по 15000–20000 клеток/лунку в 96-луночном планшете (Corning № 3842, черные, прозрачное дно). В 1-й день среду удаляли, переворачивая планшет. Добавляли свежую базальную среду по 50 мкл на лунку и клетки инкубировали в течение 60 минут.

Производные IL-22 тестировали вместе с вариантами hIL-22 и hIL-22, имеющими вариации каркаса, только в качестве компараторов. Количество «п» животных, использованных для тестирования каждого производного или компаратора, варьировало от 1 до 36.

Таким образом, в каждую лунку добавляли по 50 мкл разбавленного производного или компаратора (разбавленного в базовой среде) и планшет оставляли на четыре часа. Поэтому производные и компараторы были разбавлены в 2 раза, так как они были разбавлены 50 мкл среды, уже находящейся в лунках. Стимуляцию заканчивали через четыре часа добавлением 100 мкл реагента Steadylite plus. (Perkin Elmer кат. № 6066759). Планшет запечатывали TopSeal A, встряхивали при 450 об/мин в течение 15 минут, затем считывали с помощью Mithras или аналогичной системы не позднее, чем через 12 часов.

Анализ данных был выполнен с помощью Graphpad Prism. Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀) каждого производного или компаратора оценивали как меру его эффективности. EC₅₀ определяли с помощью Log(соединение) к ответу - переменный наклон (4p). Наклон холма был ограничен до 1 в качестве стандарта.

Второй анализ активности *in vitro* измерял pSTAT3 в клетках HepG2 - линии клеток печени человека, эндогенно экспрессирующих IL-22Ra и IL-10Rb.

В день 1 клетки HepG2 высевали в количестве 25000-30000 клеток/лунку в 96-луночный планшет (Bioscoat № 35-4407 Becton Dickinson). Клеточная среда, используемая для посева и пассирования, представляла собой DMEM (1x) + 25 mM (4,5 г/л) глюкозы, -пирувата (Gibco, кат. № 61965-026) + 10 % (масс./об.) FCS + 1 % (масс./об.) P/S. На 2-й день клетки были готовы к анализу. Клетки выращивали в условиях «голодания» 0,1 % (масс./об.) FCS (т.е. с очень низкой концентрацией альбумина) в DMEM (Gibco, кат. № 61965-026) – в каждую лунку добавляли 50 мкл и оставляли на 60 минут.

Тесты проводились в семи концентрациях каждого производного или компаратора в качестве стандартных (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 нМ) с использованием технических повторностей. Таким образом, в каждую лунку добавляли 50 мкл разбавленного производного или компаратора (разбавленного 0,1 % (масс./об.) FCS в DMEM) и планшет оставляли на 15 минут. Поэтому производные и компараторы были разбавлены в 2 раза, так как они были разбавлены 50 мкл среды, уже находящейся в лунках. Для лизиса клеток

из клеток удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 50 мкл свежеприготовленного 1 х лизирующего буфера (лизирующий буфер SureFire из набора). Планшет встряхивали при 350 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре.

Протокол анализа AlphaScreen® SureFire® STAT3 (p-Tyr705) (Perkin Elmer кат. № TGRS3S (500-10K-50K)) использовали для измерения индуцированного IL-22 фосфорилирования STAT3. В связи с этим 4 мкл лизата переносили в 384-луночный проксипланшет для анализа (добавляя по 4 мкл положительного и отрицательного контроля). Непосредственно перед использованием готовили смесь акцепторов (путем 5-кратного разбавления активационного буфера в реакционном буфере и 50-кратного разведения акцепторных гранул в разведенном буфере). В каждую лунку добавляли по 5 мкл акцепторной смеси, планшет заклеивали адгезивной пленкой Topseal A и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре. Непосредственно перед использованием готовили донорскую смесь (путем 20-кратного разбавления донорских гранул в буфере для разведения). В лунки при слабом освещении добавляли по 2 мкл донорской смеси. Планшет снова запечатывали адгезивной пленкой Topseal A и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре. Планшет считывали на совместимом с Alpha Technology ридере планшетов. Анализ данных был выполнен с помощью Graphpad Prism. Во-первых, была проведена нелинейная регрессия с использованием логарифмического (составного) анализа в сравнении с откликом - переменным наклоном (4p) в Prism. Наклон холма был ограничен до 1. Y=верхняя часть контрольного соединения (hIL-22, меченного His, или hIL-22) затем использовали для нормализации в Prism. 0 % было установлено для наименьшего значения в каждом наборе данных, а 100 % – для Y=top из приведенной выше нелинейной регрессии (для контроля). Нелинейную регрессию повторяли, как указано выше, и % активности/масс. и EC₅₀ тестируемых производных считывали в результатах под верхним и EC₅₀ соответственно.

Результаты

В таблице 11 показаны EC₅₀ ключевых производных и компараторов, измеренные в анализе репортерного гена клеток ВНК для активации STAT3, опосредованной рецептором IL-22.

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

Таблица 11: Значения EC₅₀ для ключевых производных и компараторов в анализе клеток ВНК

Поскольку анализ клеток ВНК содержал большое количество альбумина, измеренная EC₅₀ включала эффект связывания альбумина при тестировании производных.

Было показано, что компаратор 4, вариант IL-22, имеющий только вариации каркаса, эквивалентен hIL-22. Производное 3, имеющее тот же каркас, что и у компаратора 4, но ковалентно присоединенное к связывающему альбумин веществу со средней аффинностью (двухосновная кислота C16), показало четырехкратное снижение активности по сравнению с hIL-22. Производное 1, опять же имеющее такой же каркас, но ковалентно присоединенное к высокоаффинному связывающему альбумин веществу (двухосновная кислота C18), показало лишь семикратное снижение эффективности по сравнению с hIL-22.

Сканирование положений алкилирования и вариаций каркаса выполняли со смещением на фоне 35Q, 64Q (т.е. два из трех сайтов гликозилирования IL-22 мутировали) путем сравнения результатов для производных 6-9. Ковалентные сайты связывания в этих производных были выбраны на основе анализа структуры IL-22, определяющего положения, которые, как ожидается, будут экспонированы на поверхности и не будут участвовать в связывании с рецептором. Результаты, полученные с этими производными, демонстрируют, что замена Cys и ковалентное присоединение жирной кислоты могут

допускаться в нескольких (выбранных) положениях, что было неожиданно для авторов изобретения.

В таблице 12 показаны EC_{50} ключевых производных и компараторов, измеренные в анализе клеток НерG2 для рSTAT3.

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

Таблица 12: Значения EC_{50} для ключевых производных и компараторов в анализе клеток НерG2

В анализе клеток НерG2 с уровнем эндогенной экспрессии рецепторов, небольшим усилением сигнала и отсутствием альбумина производное 1 имело в 2,5 раза более низкую активность по сравнению с hIL-22 (аналогично компаратору 4, варианту hIL-22, имеющему тот же каркас, что и производное 1, но без жирных кислот).

В таблице 13 сопоставлены результаты анализов клеток ВНК и НерG2 для оценки ковалентного связывания жирных кислот в N-концевом удлинении и мутации сайтов гликозилирования. НО = не определено.

ID	EC_{50} клеток ВНК (нМ)	EC_{50} клеток НерG2 (нМ)
hIL-22	0,07	3,88
Производное 1	0,48	10,13
Производное 2	НО	6,98
Производное 4	0,18	НО
Производное 6	0,61	14,86

Таблица 13: Значения EC_{50} для ключевых производных и hIL-22 в анализах клеток ВНК и НерG2

Производное 6 отличается от производного 1 дополнительными заменами N35Q и N64Q (два из трех сайтов гликозилирования мутированы), но они равноэффективны (с тенденцией к несколько более низкой эффективности для Производного 6).

В то время как производные 2 и 4 имеют 15-мерный N-концевой участок с остатком Cys для присоединения жирной кислоты в удлинении (-7C), неожиданно показано, что он хорошо переносится.

Заключение

Снижение активности, наблюдаемое при ковалентном присоединении жирных кислот в протестированных производных по изобретению, в первую очередь было вызвано связыванием альбумина с небольшим вкладом замен в каркасы. Это было продемонстрировано удивительной равноэффективностью компаратора 4 и hIL-22. Для сравнения, как уже упоминалось, Genentech сообщает о 34-кратном снижении активности *in vitro* для слитого с Fc IL-22.

В анализе клеток HepG2 с очень низким уровнем альбумина производное 1 (производное IL-22, которое показало семикратное снижение эффективности в анализе ВНК (со связыванием альбумина)) показало только 2,5-кратное снижение активности по сравнению с hIL-22.

Эквивалентность производных 1 и 6 (таблица 13) показала, что мутации 35Q и 64Q удивительно переносятся без влияния на активность.

Таким образом, производные IL-22 сохраняют высокую активность в присутствии альбумина и почти эквивалентны активности hIL-22 в отсутствие альбумина. Замена Cys и ковалентное присоединение жирных кислот допустимы в нескольких положениях.

Таким образом, данные показывают, что производные по данному изобретению демонстрируют хорошую биодоступность и эффективность, предлагая, таким образом, новое и улучшенное лечение широкого диапазона показаний, включая заболевания, нарушения и состояния метаболизма, легких, кишечника, почек и кожи.

Пример 3 – Исследование эффективности *in vivo* при диабете

Это исследование было разработано для изучения эффекта однократного ежедневного приема производного по изобретению в течение 8-16 дней на модели мышей с диабетом. Исследование проводилось в лечебном (не профилактическом) режиме, что означает, что патология сахарного диабета развилась до начала дозирования. Поскольку модель мыши имеет ожирение печени (нокаут рецептора лептина), она также функционирует как метаболическая модель заболевания печени.

Методы

Самцов мышей C57BKS db/db в возрасте 7-8 недель получали от Charles River Laboratories (день -10) и акклиматизировали в течение по меньшей мере одной недели до начала экспериментов. Через неделю после прибытия (день -3) мышей рандомизировали и поместили в группы по 10 особей (или по отдельности для исследования потребления пищи). На -3 день и в каждый из дней 1-16 исследования измеряли уровень глюкозы в крови и потребление пищи.

Производное IL-22 (производное 1) тестировали вместе со слитым с Fc IL-22 (hFc-hIL-22) в качестве сравнения и только носителем в качестве отрицательного контроля. Каждый агент вводили подкожно в суточной дозе 0,1, 0,25, 0,5 или 1,0 мг/кг в каждый из дней 1-16 у мышей db/db с диабетом (n=6-10 в каждой группе). Потребление пищи было снижено после приема производных/компараторов/контрольных доз.

Уровень глюкозы в крови измеряли ежедневно в течение всего периода исследования. Образцы крови из глаз брали при прекращении у анестезированных мышей. Кровь по 500 мкл собирали в пробирки с ЭДТА. Образцы хранили на льду и центрифугировали в течение 5 минут при 6000 G при 4 °C в течение 20 минут. Плазму разделяли на микропробирки объемом 0,75 мл и немедленно замораживали для последующего измерения концентраций компонентов.

Помимо измерения концентрации производного или компаратора, в ходе исследования измеряли уровни в плазме биомаркеров взаимодействия с мишенями (белков острой фазы, полученных из печени, гаптоглобина и компонента сывороточного амилоида P (SAP), а также в конце исследования измеряли уровни кишечного пептида YY (PYY)). Гаптоглобин измеряли на приборе COBAS (Roche Diagnostics) с коммерческим набором в соответствии с инструкциями производителя. PYY измеряли с помощью коммерческого анализа ИФА (ALPCO), распознающего мышиный и крысиный PYY в соответствии с инструкциями производителя. SAP измеряли с помощью коммерческого анализа ИФА (R&D Systems), распознающего Pentraxin 2/SAP мыши, в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Уровни глюкозы в крови на протяжении всего исследования показаны на фиг. 5 и 6А.

Как видно из фиг. 5, hIL-22 и вариант hIL-22, имеющие только вариации каркаса (компаратор 3), не снижали уровень глюкозы в крови в ходе исследования по сравнению с контрольным носителем.

Как видно из фиг. 6А, производное 1 и hFc-hIL-22 снижали уровень глюкозы в крови сравнимым образом до нормальных уровней с несколько более высокой эффективностью производного 1 в последние дни исследования, несмотря на более высокое целевое участие hFc-hIL-22, отражающий более высокий уровень стационарного воздействия в конкретном исследовании. У обработанных животных наблюдалось снижение потребления пищи по сравнению с контролем, получавшим носитель (см. фиг. 6В). Таким образом, тестируемое производное нормализовало уровень глюкозы в крови в модели db/db аналогично hFc-hIL-22; как указано выше, такого эффекта не наблюдалось с hIL-22 или компаратором 3.

Уровень биомаркеров целевого взаимодействия, гаптоглобина, SAP и PYY, измеренный в конце исследования, показан на фиг. 7А-С соответственно. Как видно из графиков, все три биомаркера взаимодействия с мишенью активировались тестируемым производным и hFc-hIL-22, в большей степени hFc-hIL-22, чем производным 1.

На фиг. 8 показаны данные доза-реакция для производного 6 (еще одно производное по изобретению, такое же, как производное 1, но с дополнительными заменами в двух сайтах гликозилирования). Все три протестированные дозы (0,1, 0,25 и 0,5 м/кг) были эффективны в снижении уровня глюкозы в крови с течением времени, и тем более эффективно с увеличением концентрации.

Заключение

Оба протестированных производных и hFc-hIL-22 нормализовали уровень глюкозы в крови в модели db/db, тем самым демонстрируя терапевтический эффект *in vivo*. Важно отметить, что такого эффекта не наблюдалось при дозировании hIL-22, что свидетельствует о том, что хроническое воздействие, полученное с производными длительного действия и слиянием с Fc, необходимо для терапевтического эффекта. Хотя механизм действия антидиабетического эффекта еще полностью не выяснен, считается, что эффекты IL-22 на печень (печеночный глюконеогенез и липогенез) вносят основной вклад.

Было также показано, что прием пищи снижается при лечении производным по изобретению, что демонстрирует эффективность лечения ожирения.

Было также обнаружено, что биомаркеры взаимодействия с мишенью активируются производными и hFc-hIL-22. Известно, что определенные биомаркеры, измеренные у мышей db/db, переносятся на человека.

Важно отметить, что период полувыведения из кровотока ($T_{1/2}$) hFc-hIL-22, введенного подкожно, выше, чем у производного 1, особенно у мышей ($T_{1/2}$ равное 20 и 8 часов соответственно; см. Таблицу 7). Следовательно, экспозиция hFc-hIL-22 выше в равновесном состоянии. Это также подтверждается наблюдением, что биомаркеры взаимодействия с мишенью (гаптоглобин, SAP и PYY) были выше в группе, получавшей hFc-hIL-22, чем в группе, получавшей производное 1 (фиг. 7), демонстрируя более высокое взаимодействие с мишенью само по себе в показанном эксперименте. Таким образом, несмотря на более высокое воздействие и воздействие на мишень, эффективность слитого Fc (hFc-hIL-22) была ниже по сравнению с производным по изобретению (производное 1) в последние три дня 16-дневного исследования дозирования.

Таким образом, данные показывают, что производные по изобретению демонстрируют хорошую терапевтическую эффективность в мышинной модели диабета и заболевания

печени. Поскольку известно, что конкретные биомаркеры, измеренные у мышей db/db, переносятся на человека, разумно предположить, что такая терапевтическая эффективность также переносится.

Пример 4 – Исследование эффективности *in vivo* при повреждении печени (i)

Это исследование было разработано для изучения эффекта дозирования производных по изобретению на мышинной модели с повреждением печени. Исследование было проведено в превентивном режиме, что означает, что повреждение печени было вызвано только после начала приема препарата.

Методы

Были получены 10-недельные мыши C57Bl/6Rj, которых акклиматизировали в течение одной недели до начала исследования. Повреждение печени индуцировали однократной внутрибрюшинной дозой (300 мг/кг, 20 мл/кг) АРАР. Тестируемые производные IL-22 (производные 1 и 6) вводили подкожно в дозе 1,5 мг/кг за два часа до введения АРАР вместе с контрольными носителями (n = 5-10). Исследование было прекращено через 24 часа после введения дозы АРАР. Терминальное кровотоечение было обеспечено для измерения аланинтрансаминазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) плазмы.

Образцы крови собирали в пробирки с гепарином, плазму отделяли и хранили при -80 °С до анализа. АЛТ и АСТ измеряли с помощью коммерческих наборов (Roche Diagnostics) на автоанализаторе COBAS c501 в соответствии с инструкциями производителя.

Печень подвергали фиксации в формалине и заливке в парафин для гистологического анализа.

Пролиферацию измеряли с помощью иммуногистохимического (ИНС) окрашивания ki67. ИНС-положительное окрашивание количественно оценивали с помощью анализа изображений с использованием программного обеспечения VIS (Visiopharm, Дания).

Апоптоз измеряли в анализе мечения концов терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой dUTP (TUNEL). Вкратце, предметные стекла со срезами, залитыми парафином, депарафинировали в ксилоле и регидратировали в градиенте этанолов. Срезы предварительно обрабатывали протеиназой К, а активность эндогенной пероксидазы блокировали перекисью водорода. Смесь TUNEL (набор для обнаружения гибели клеток *in situ*, POD, Roche) добавляли к предметным стеклам, после чего проводили амплификацию с пероксидазой хрена (HRP) и визуализацию с помощью диаминобензидина (DAB) (Chromogen). Наконец, предметные стекла докрашивали гематоксилином и закрывали покровным стеклом.

Результаты

Уровни АЛТ и АСТ в плазме по окончании исследования показаны на фиг. 9А и 9В соответственно. Было показано, что количество АЛТ и АСТ значительно снижается у мышей, получавших производное 1 или 6 до повреждения печени, по сравнению с контролем, получавшим носитель/АРАР.

Количество TUNEL- и ki67-позитивных клеток по окончании исследования показано на фиг. 10А и 10В соответственно. Количество TUNEL-позитивных клеток было (значительно) снижено у мышей, получавших производное 1 или 6 до повреждения печени, по сравнению с контролем, получавшим носитель/АРАР. Количество ki67-позитивных клеток было сопоставимо в группах, получавших АРАР.

Заключение

АЛТ и АСТ ферменты печени, используемые в качестве индикаторов повреждения печени. Следовательно, было показано, что производные 1 и 6 защищают печень от повреждения, вызванного АРАР.

Результаты анализа TUNEL показали, что производные 1 и 6 защищают от апоптоза, вызванного повреждением печени, по сравнению с контролем, получавшим носитель/АРАР. Однако эти производные IL-22 не влияли на клеточную пролиферацию. Поскольку пролиферация физиологически активируется в ответ на повреждение (как видно в контроле), результаты демонстрируют пролиферативное действие производных 1 и 6, поскольку за уменьшением повреждения не следует снижение пролиферации (отношение пролиферации к повреждению увеличивается).

Таким образом, данные показывают, что производные по изобретению демонстрируют хорошую эффективность в защите от повреждения печени в мышинной модели. Известно, что конкретные биомаркеры, измеренные у мышей, переносятся на человека, поэтому разумно предположить, что наблюдаемая защита также будет переноситься.

Пример 5 – Исследование эффективности *in vivo* при повреждении легких

Это исследование было разработано для изучения эффекта дозирования производного по изобретению на модели крыс с повреждением легких. Исследование проводилось как в профилактическом, так и в лечебном режиме, что означает, что дозирование начиналось до того, как было вызвано повреждение легких, и продолжалось после этого.

Методы

Чтобы вызвать повреждение легких, 100 мкл блеомицина вводили в легкие самцов крыс Sprague Dawley путем ротоглоточной аспирации в виде однократной дозы на 1 день (группы 2-6). В качестве отрицательного контроля вводили физиологический раствор (группа 1).

Животным в группах 3, 4 и 5 вводили (путем подкожной инъекции) один раз в день производное 6 в дозах 0,5, 1,5 или 4,5 мг/кг соответственно с 1-го по 3-й день. Животным в группе 6 вводили дозу (перорально через желудочный зонд) один раз в день с преднизолоном в дозе 10 мг/кг с 1-го по 3-й день.

Для измерения растворимого коллагена в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) крыс, легкие промывали (3 x 4 мл) стерильным PBS (без кальция и магния), включая добавленный коктейль ингибиторов протеазы, и лаваж от каждого животного помещали в одну пробирку. Растворимый коллаген измеряли в супернатанте ЖБАЛ с помощью анализа растворимого коллагена Sircol S1000 (Biocolor) (Charles River Laboratories).

Всех животных подвергали вскрытию на 4-й день (терминальная эвтаназия). Правое легкое брали для гистопатологического исследования у всех животных и фиксировали надуванием 10 % нейтральным забуференным формалином (NBF), а затем фиксировали погружением в NBF. Из правой каудальной доли легкого вырезали три параллельных продольных среза и помещали в кассету 01. Правая краниальная, средняя и добавочная доли легкого также были разрезаны в продольном направлении и помещены в кассету 02.

Из каждой кассеты готовили по два среза; одно стекло окрашивали гематоксилином и эозином (H&E), а другое окрашивали гематоксилином и пикросириусом красным (H&PSR). Затем каждому срезу присваивался случайный номер с помощью генератора случайных чисел. Идентификационный ключ был записан в электронную таблицу Microsoft Excel, и копия была предоставлена исследователю-патологу после оценки срезов. Таким образом, шесть срезов на легкое считывались вслепую.

Затем ветеринарный патологоанатом оценивал каждый срез на каждом предметном стекле, окрашенном H&E, по степени тяжести воспаления (где 0 = отсутствует, 1 = минимальное, 2 = легкое, 3 = умеренное и 4 = тяжелое). Был рассчитан средний и медианный балл по группе. Патолог также оценивал каждый раздел на каждом предметном стекле, окрашенном H&PSR, на предмет тяжести фиброза (используя модифицированную шкалу Эшкрофта от 0 = низкая до 8 = высокая). Был рассчитан средний и медианный балл для каждой группы и проведен непараметрический ANOVA, послетестовый анализ Крускала-Уоллиса.

Результаты

Сводка результатов микроскопии показана в Таблице 14, в которой показаны средние и медианные оценки воспаления и фиброза для каждой группы.

Группа	1 физиологический раствор / носитель	2 блео / носитель	3 блео / производное б 0,5 мг/кг	4 блео / производное б 1,5 мг/кг	5 блео / производное б 4,5 мг/кг	6 блео / преднизолон
Индуцированный фиброз	Физиологический раствор	Блеомицин				
Кол-во обследованных животных	10	10	10	10	10	10
Воспаление						
Среднее группы	0,1	1,6	1,3	1,3	1,0	1,1
Медиана группы	0,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Фиброз						
Среднее группы	0,0	1,2	0,8	0,9	0,7	0,9
Медиана группы	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0

Таблица 14: Сводка результатов микроскопии в модели крысы с повреждением легких

Как видно из сравнения групп 1 и 2 в таблице 14, блеомицин индуцировал как воспаление легких, так и фиброз в модели крыс. Средние и медианные баллы были ниже в группах 3-5, т.е. у крыс, получавших производное б, производное по изобретению. Эти более низкие показатели были сравнимы с показателями, наблюдаемыми у крыс, получавших преднизолон (группа 6).

Медианные показатели воспаления и фиброза для каждого животного в исследовании также показаны на фиг. 11А и 11В соответственно.

Как показано на фиг. 11А, медианный показатель воспаления в группе был повышен в контрольных группах блеомицин/носитель (группа 2) по сравнению с отрицательными контролями (группа 1). Медианные показатели воспаления в группе были снижены у крыс, получавших производное б (и значительно снизились в группе высокой дозы 5) и преднизолона (группа 6) по сравнению с контрольными группами блеомицина/носителя.

Как показано на фиг. 11В, медианный показатель фиброза в группе был повышен в контрольных группах блеомицин/носитель (группа 2) по сравнению с отрицательными контролями (группа 1). Однако медианные оценки фиброза в группе были снижены у крыс, получавших производное 6 (и значительно уменьшились в группе с высокой дозой 5), по сравнению с контрольной группой блеомицина/носителя, но не с контрольной группой преднизолона.

Как показано на фиг. 11С, количество растворимого коллагена в ЖБАЛ после индуцированного блеомицином повреждения легких было увеличено в контрольной группе, получавшей блеомицин/носитель (группа 2), по сравнению с отрицательным контролем (группа 1), и это количество не снижалось при лечении преднизолоном (группа б). Однако значительно сниженное количество растворимого коллагена наблюдалось в ЖБАЛ у крыс, получавших производное 6 (во всех протестированных дозах), по сравнению с контрольными группами, получавшими блеомицин/носитель. Поскольку растворимый коллаген в БАЛ является индикатором фиброза, эти результаты подтверждают данные гистологии, приведенные непосредственно выше.

Заключение

Результаты микроскопических исследований показали, что производные по изобретению способны предотвращать и/или уменьшать индуцированное блеомицином воспаление легких и фиброз в модели крыс. Эффекты, наблюдаемые в отношении воспаления, были сопоставимы с эффектами, наблюдаемыми при применении преднизолона, кортикостероида, известного для лечения воспаления легких. Однако производные по изобретению оказывали уникальное действие на фиброз, не наблюдаемое у преднизолона.

Пример 6 – Исследование эффективности *in vivo* при колите

Это исследование было разработано для изучения эффекта дозирования производного по изобретению на мышинной модели колита. Исследование проводилось как в режиме профилактики, так и в режиме лечения, то есть введение дозы начинали в тот же день, когда было вызвано воспаление толстой кишки, и продолжали после этого.

Методы

Самок мышей C57Bl/6JRj, которых кормили кормом, рандомизировали на пять групп (n=8 в группе) в зависимости от массы тела. DSS использовали для индуцирования колита в четырех из пяти групп. Эти мыши получали DSS с питьевой водой в течение семи дней с 0 по 6 день исследования. В пятой группе животные получали воду без DSS и, следовательно, служили здоровым контролем. Начиная с 0-го дня исследования, мышам DSS вводили носитель, тестируемое производное IL-22 (производное 6; дозировка 0,35 мг/кг или 1 мг/кг

внутрибрюшинно) или слитый с Fc IL-22 в качестве компаратора (hFc-hIL -22; по 0,5 мг/кг внутрибрюшинно) один раз в сутки в течение 10 дней. Массу тела, потребление пищи и воды контролировали ежедневно.

На 10-й день исследования у мышей собирали образцы крови в пробирки с ЭДТА, плазму отделяли и хранили при -80 °С до анализа. Гамма регенерирующего островкового белка 3 (Reg3g) измерялась в повторях с использованием набора ИФА (Cloud-Clone Corp) в соответствии с инструкциями производителя. Reg3g представляет собой маркер вовлеченности мишени IL-22.

По окончании исследования кишечник извлекали для стереологического анализа. Соответственно, кишечник промывали ледяным физиологическим раствором и осторожно удаляли его содержимое перед взятием проб.

Кишечник инфильтрировали формалином на ночь (Tissue-Tek VIP) и затем заливали в блоки парафина. Затем из фиксированного формалином кишечника брали образцы от проксимального к дистальному направлению с использованием принципов систематической однородной случайной выборки (SURS), в результате чего было получено в общей сложности четыре фрагмента, которые были помещены в мультикассету. Все фрагменты ткани были размещены таким образом, чтобы на более позднем этапе была возможна идентификация отдельных срезов. Парафиновые блоки были обрезаны, а верхние срезы толщиной 5 мкм были вырезаны и помещены на предметные стекла Superfrost+. Для толстой кишки вырезали еще один срез на расстоянии 500 мкм от верхнего среза, таким образом получая в общей сложности восемь срезов толстой кишки от каждого животного.

Объем воспаления толстой кишки измеряли стереологически, то есть с использованием трехмерной интерпретации двухмерных поперечных срезов толстой кишки. Оценку стереологического объема проводили с использованием системы newCAST (Visiopharm) на отсканированных предметных стеклах, окрашенных Н&Е. Общий объем кишечника, объем слизистой оболочки, объем подслизистой и мышечной оболочки и объем воспаленной ткани оценивали путем подсчета точек с использованием сетки соответствующего размера, где подсчитывались все точки, попадающие в интересующую структуру. Количество точек, попавших в интересующую структуру, было преобразовано в объем согласно следующему математическому соотношению:

$$\text{Объем}_{ref} = \sum p \cdot A(p) \cdot t$$

где $A(p)$ - площадь на точку, p - общее количество точек, попадающих в интересующую структуру, а t - расстояние между срезами. Рассчитывали средний объем воспаления на группу и подвергали статистическому анализу.

Морфологию толстой кишки также оценивали при прекращении путем просмотра предметных стекол, окрашенных гематоксилином и эозином.

Результаты

Объем воспаления толстой кишки показан на фиг. 12. Было показано, что воспаление предотвращается у мышей, получавших производное β в любой дозе, по сравнению с контрольным носителем (также содержащим DSS). Примечательно, что воспаление оставалось на нормальном уровне в группах, леченых производным β , о чем свидетельствует объем воспаления толстой кишки, который был таким же для леченых групп, как и у здоровых контролей (носитель без DSS). То же самое было верно для группы, получавшей hFc-hIL-22.

Репрезентативные изображения окрашивания гематоксилин-эозином морфологии толстой кишки при терминации показаны на фиг. 13. После обработки DSS у животных, получавших носитель, можно наблюдать ранение эпителия слизистой оболочки (отмечено черной стрелкой), но не у животных, получавших производное β в любой дозе или hFc-hIL-22. Это свидетельствует о защитном действии на эпителиальную ткань.

Уровни Reg3g в плазме показаны на фиг. 14. Лечение DSS индуцировало увеличение базальных уровней Reg3g (сравните носитель с отсутствием носителя DSS). Дальнейшее увеличение не было обнаружено в группе с низкой дозой (0,35 мг/кг) производного β , но наблюдалось в группе с более высокой дозой (1 мг/кг) производного β и в группе с hFc-hIL-22. Более высокие уровни Reg3g в группе, получавшей hFc-hIL-22 (0,5 мг/кг), по сравнению с группой, получавшей производное β (1 мг/кг), указывали на более высокое воздействие на мишень, несмотря на более низкую дозу, что, вероятно, было связано с более длительным периодом полувыведения в мышцах hFc-hIL-22 ($T_{1/2}$ 30 часов для hFc-hIL-22 по сравнению с 9,1 часа для производного β).

Заключение

Таким образом, данные показывают, что производное по изобретению демонстрирует хорошую эффективность в защите от колита и повреждения эпителия слизистой оболочки на мышинной модели. Это указывает на то, что было найдено новое и улучшенное лечение кишечных заболеваний, нарушений и состояний. В частности, результаты демонстрируют возможность лечения заболеваний, характеризующихся повреждением эпителия слизистой оболочки, таких как воспалительное заболевание кишечника.

Пример 7 – Исследование эффективности *in vivo* при повреждении печени (ii)

Это исследование было разработано для изучения эффекта дозирования производного по изобретению на второй мышшиной модели с повреждением печени (первая описана выше в примере 4). Исследование было проведено в превентивном режиме, что означает, что повреждение печени было вызвано только после начала приема препарата.

Методы

Самцов мышей C57Bl6/6j разделили на пять групп (n=8 в группе). Тестируемое производное П-22 (производное 1) вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг в двух из пяти групп через -26 часов и -2 часа относительно лечения ConA. Еще две группы получили носитель только в эти моменты времени. ConA вводили всем четырем группам в виде внутривенного болюса в течение 30 секунд в дозе 15 мг/кг, чтобы вызвать повреждение печени. Пятая группа не получала ConA (только носитель, как указано выше), как и здоровые контроли.

Через 8 или 24 часа после инъекции ConA мышей помещали под изофлурановую анестезию и брали максимальный объем крови путем пункции сердца (используя полипропиленовую пробирку с сывороточным гелем, содержащим активатор свертывания). Мышей, не получавших лечения (группа 5), умерщвляли через 8 часов. Кровь смешивали с активатором свертывания в каждой пробирке, несколько раз переворачивая пробирку. Пробирку выдерживали в течение 15 минут при комнатной температуре, а затем центрифугировали при 2000 g в течение 10 минут при 4 °C. АЛТ и АСТ измеряли в образцах сыворотки с помощью автоматизированной системы (Konelab 20) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Уровни АЛТ и АСТ в плазме по окончании исследования показаны на фиг. 15А и 15В соответственно. Было показано, что количество АЛТ и АСТ было снижено у мышей, получавших производное 1 до повреждения печени, по сравнению с контролем, получавшим носитель/ ConA, в обе испытанные точки времени.

Заключение

АЛТ и АСТ ферменты печени, используемые в качестве индикаторов повреждения печени. Следовательно, было показано, что производное 1 защищает печень от повреждения, вызванного ConA, точно так же, как оно защищало от повреждения, вызванного АРАР в примере 4. Известно, что конкретные биомаркеры, измеренные у мышей, переносятся на человека, поэтому разумно предположить, что наблюдаемая защита также будет переноситься.

Пример 8. Исследование эффективности *in vivo* при ожирении и НАСГ.

Это исследование было разработано для изучения эффекта дозирования производного по изобретению на модели мышей с ожирением и НАСГ. Исследование проводилось в лечебном (не профилактическом) режиме, что означает, что ожирение и патология НАСГ развились до начала дозирования.

Методы

Модель мышей с ожирением, вызванным диетой, была основана на самцах мышей C57BL/6JRj, которых кормили пищей с высоким содержанием жиров в течение по меньшей мере 30 недель до эксперимента. В рационе было много жиров (40 %), фруктозы (22 %) и холестерина (2 %) (Research Diets D09100310). Это привело к ожирению, НАЖБП и, в конечном счете, к НАСГ.

Животных содержали в одиночном помещении за шесть дней до введения первой дозы тестируемого производного (или другого вещества), а массу тела ежедневно контролировали на протяжении всего эксперимента. Мышей разделили на шесть групп (n = 12 в группе). Дозирование начинали на 0 день исследования (обозначено пунктирной линией на фигуре 16) и вводили один раз в день подкожно в следующих дозах.

Семаглутид, агонист рецептора GLP-1 длительного действия, использовали в качестве положительного контроля в первой группе, а также исследовали в комбинации с тестируемым производным IL-22 (производное 6) во второй группе. Дозу семаглутида постепенно титровали по следующей схеме: 0,6 нмоль/кг в день 0 - 1,2 нмоль/кг в день 1 - 2,4 нмоль/кг в день 2 - 4,8 нмоль/кг в день 3 - 12 нмоль/кг в день 4 - 30 нмоль /кг день 5. В комбинированной группе дозирование семаглутида начинали на 0-й день, а дозирование производного 6 начинали на 12-й день (обозначено пунктирной линией на фигуре 16) после того, как потеря массы стабилизировалась в группе, получавшей семаглутид.

Дозировка производного 6 в третьей группе с «высокой дозой» постепенно титровалась в соответствии со следующим графиком: 0,05 мг/кг в день 0 – 0,1 мг/кг в день 1 – 0,15 мг/кг в день 2 – 0,2 мг/кг в день 3 – 0,25 мг/кг день 4. Доза была изменена с 0,25 мг/кг на 0,1 мг/кг на 14-й день (обозначено пунктирной линией на фиг. 16). В четвертой группе с «низкой дозой» дозировка производного 6 начиналась с 0,05 мг/кг без дальнейшего титрования.

В пятой группе дозу слитого с Fc IL-22 (hFc-hIL-22) в качестве компаратора постепенно титровали в соответствии со следующей схемой: 0,02 мг/кг в день 0 – 0,04 мг/кг в день 1 – 0,06 мг/кг в день 2 – 0,08 мг/кг в день 3 – 0,1 мг/кг в день 4. Доза hFc-hIL-22 была выбрана для соответствия группе 0,25 мг/кг производного 6 для воздействия на мишень на основании более длительного периода полувыведения и, соответственно, более высокого

воздействия на мишень по сравнению с производным 6, как показано в примере 6 (см. фиг. 14).

Шестой группе вводили только носитель в качестве отрицательного контроля.

Уровни триглицеридов плазмы (ТГ) измеряли исходно (день -2), на неделе 2 (день 14) и на неделе 4 (день 28) после начала дозирования. В частности, образцы крови из хвоста отбирали для анализа путем забора объема хвостовой крови 200 мкл или меньше в открытую пробирку Microvette (100 мкл или 200 мкл), обработанную соответствующим антикоагулянтом. Кровь помещали при 4 °С до центрифугирования при 3000 g в течение 10 минут. Супернатанты плазмы переносили в новые пробирки, немедленно замораживали на сухом льду и хранили при -80 °С. Уровни ТГ измеряли с помощью коммерческих наборов (Roche Diagnostics) на автоанализаторе cobas[®] с 501 в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Масса тела в ходе эксперимента показана на фиг. 16.

Исследование продемонстрировало дозозависимую высокую эффективность производного 6 в снижении массы тела на модели мышей с ожирением. Кроме того, он продемонстрировал аддитивность к агонисту рецептора GLP-1 (семаглутиду), который изучается на поздних стадиях клинических испытаний для лечения ожирения. Данные свидетельствуют о превосходстве производного 6 по сравнению с hFc-hIL-22 в индуцировании потери массы. Важно отметить, что hFc-hIL-22 имеет более длительный период полувыведения у мышей, чем производное 6, и продемонстрировал более высокое воздействие на мишени даже при половинной дозе производного 6. Таким образом, доза 0,1 мг/кг hFc-hIL-22, используемая в этом исследовании, была выбрана для того же воздействия на мишень, что и группа, получавшая 0,25 мг/кг производного 6.

Чувствительность к потере массы, вызванная производным 6, наблюдаемая здесь у мышей с ожирением, вызванным диетой, не наблюдается у худых мышей. Например, в 10-дневном исследовании колита, индуцированного DSS (пример 6) с однократным ежедневным приемом, масса тела в начале исследования составляла 19,0 г как в группе DSS/носитель, так и в группе DSS/производное 6 (0,35 мг/кг). В конце исследования масса тела составляла 17,6 г в группе DSS/носитель по сравнению с 17,4 г в группе DSS/производное 6 (0,35 мг/кг), которые не отличаются друг от друга ($p = 0,82$ в непарном t-тесте Стьюдента). Для сравнения, мыши в группах, получавших носитель и производное 6 (0,25 мг/кг), на 10-й день данного исследования имели массу тела 43,5 г и 35,2 г соответственно. Таким образом, в группе, получавшей производное 6, наблюдалась значительная потеря массы тела по

сравнению с группой, получавшей носитель ($p < 0,0001$ в непарном t-тесте Стьюдента для массы тела на 10-й день). В начале исследования масса тела была одинаковой в группе, получавшей носитель, и в группе, получавшей производное 6 (44,3 г и 44,1 г соответственно).

Уровни ТГ в плазме, измеренные на исходном уровне (день -2), 2 неделе (день 14) и 4 неделе (день 28) после начала дозирования, показаны в таблице 15.

	Носитель		hFc-hIL-22		Производное 6 (0,05 мг/кг)		Производное 6 (0,25/0,1 мг/кг)		Семаглутид (30 нмоль/кг)		Семаглутид (30 нмоль/кг) + производное 6 (0,05 мг/кг)	
	Среднее	СО С	Среднее	СО С	Среднее	СО С	Среднее	СО С	Среднее	СО С	Среднее	СО С
Исходный уровень	0,75	0,033	0,85	0,036	0,83	0,045	0,77	0,035	0,81	0,036	0,86	0,046
Неделя 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
Дельта неделя 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
Неделя 4	0,93	0,076	0,84	0,046	0,54	0,030	0,42	0,030	0,66	0,048	0,34	0,032
Дельта неделя 4	+0,17	0,079	-0,02	0,059	-0,30	0,034	-0,35	0,052	-0,14	0,066	-0,53	0,042

Таблица 15: Уровни ТГ в плазме (нмоль/л) в модели мышей с ожирением и НАСГ

Дельта относится к изменению уровня ТГ (нмоль/л) по сравнению с исходным уровнем для указанного лечения и временной точки. Как видно из Таблицы 15, изменение уровня было положительным (повышенным) для группы, получавшей носитель, и отрицательным (уменьшенным) для всех других групп.

Производное 6 имело более высокую эффективность в снижении уровня ТГ, чем семаглутид, в том числе в низкой дозе, которая вызывает меньшую потерю массы, чем семаглутид (например, дельта-уровни ТГ на 4-й неделе (нмоль/л) $-0,14 \pm 0,066$ для семаглутида, $-0,30 \pm 0,034$ для производного 6 (0,05 мг/кг) и $-0,35 \pm 0,052$ для производного 6 (0,25/0,1 мг/кг)). Результаты показывают, что производное 6 обладает высокой эффективностью в снижении ТГ, что частично не зависит от эффекта потери массы. Кроме того, наблюдалась полная аддитивность эффекта производного 6 по сравнению с семаглутидом. На 4-й неделе снижение уровня ТГ (нмоль/л), рассчитанное как дельта ТГ, составило $-0,30 \pm 0,034$ для производного 6 (0,05 мг/кг), $-0,14 \pm 0,066$ для семаглутида и $-0,53 \pm 0,042$ для семаглутида + производное 6 (0,05 мг/кг). Результаты снижения ТГ по сравнению с исходным уровнем (дельта ТГ) были получены, несмотря на то, что уровни ТГ в группе, получавшей носитель, увеличивались в ходе исследования.

Заключение

Исследование показало, что производное по данному изобретению (производное 6) может индуцировать потерю массы у мышей с ожирением дозозависимым образом, по крайней мере, до уровня, сравнимого с семаглутидом - агонистом рецептора GLP-1 длительного действия, использованным в качестве положительного контроля. Кроме того, наблюдался аддитивный эффект в отношении потери массы при использовании комбинации семаглутида и производного 6. Эффективность производного 6 в отношении снижения массы тела была выше, чем наблюдаемая с hFc-IL-h22 в дозах, выбранных для достижения аналогичного уровня воздействия на мишень. Потеря массы, вызванная производным 6 у мышей с ожирением, вызванным диетой, не наблюдалась у худых мышей, получавших DSS, что свидетельствует о том, что мыши с ожирением более чувствительны к потере массы, вызванной производным 6. Поскольку потеря массы тела, наблюдаемая у мышей с ожирением, вызванным диетой, является таким же показателем, как и у человека, разумно предположить, что наблюдаемая потеря массы также будет переноситься.

Производное 6 также показало высокую эффективность в снижении уровня ТГ. Производное 6 в обеих протестированных дозах показало более высокую эффективность, чем семаглутид, и наблюдалась полная аддитивность в отношении эффективности при комбинированном дозировании. Учитывая, что доза 0,05 мг/кг производного 6 имела более высокую эффективность, чем семаглутид, несмотря на более низкую потерю массы, можно сделать вывод, что эффект производного 6 на снижение уровня ТГ был, по меньшей мере, частично независимым от потери массы. Кроме того, производное 6 превосходило компаратор hFc-hIL-22 в обеих тестируемых дозах. Поскольку снижение ТГ, наблюдаемое

у мышей с ожирением, вызванным диетой, было таким же, как и у человека, разумно предположить, что наблюдаемый эффект также будет транслироваться. Таким образом, результаты показывают, что было найдено новое лечение расстройств и состояний, характеризующихся высокими уровнями ТГ.

Хотя в данном документе были проиллюстрированы и описаны некоторые признаки изобретения, специалистам в данной области техники может прийти на ум множество модификаций и эквивалентов. Таким образом, следует понимать, что формула изобретения предназначена для охвата всех таких модификаций и эквивалентов, которые соответствуют истинной сущности изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

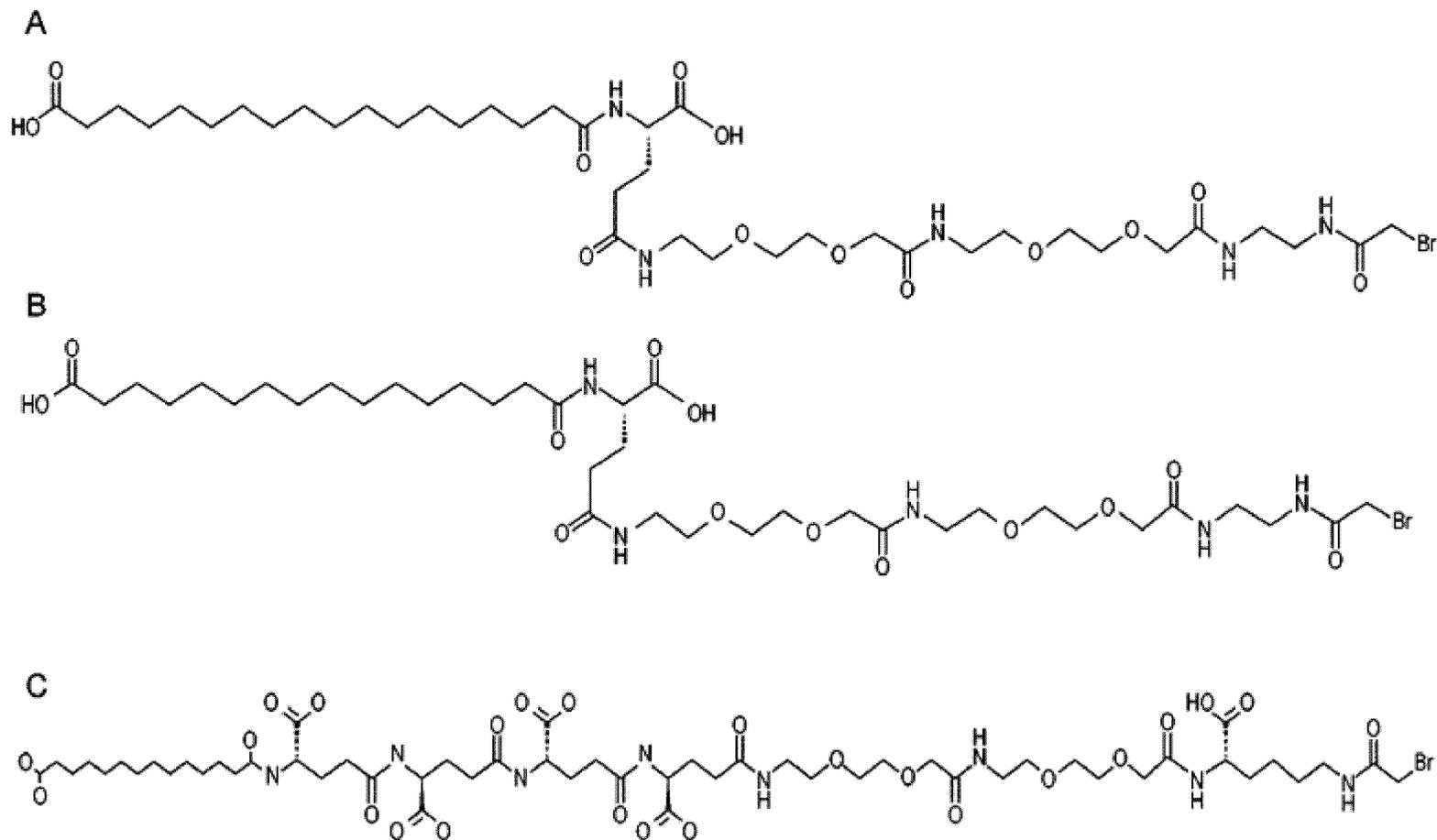
1. Производное IL-22, содержащее жирную кислоту, ковалентно присоединенную к белку IL-22.
2. Производное по п. 1, в котором жирная кислота ковалентно присоединена к белку IL-22 с помощью линкера.
3. Производное по п. 1 или п. 2, в котором жирная кислота:
 - (i) имеет Формулу I:

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

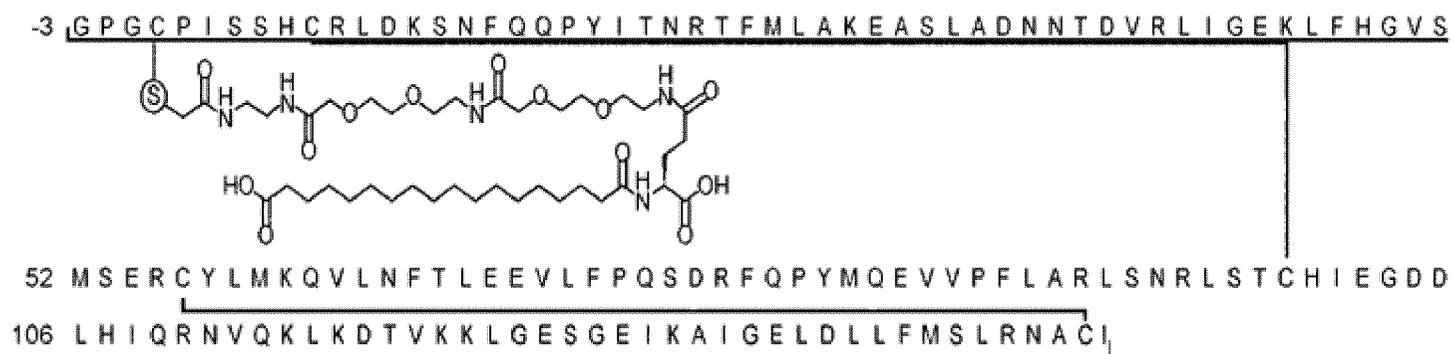
где x представляет собой целое число в диапазоне 10-18, необязательно 12-18, 14-16 или 16-18, и * обозначает точку присоединения к белку IL-22 или линкеру;
 - (ii) представляет собой двухосновную жирную кислоту;
 - (iii) представляет собой двухосновную кислоту C12, C14, C16, C18 или C20;
 - (iv) представляет собой двухосновную кислоту C16 или C18; и/или
 - (v) представляет собой двухосновную кислоту C18.
4. Производное по любому из предшествующих пунктов, в котором белок IL-22 представляет собой нативный зрелый человеческий IL-22 (hIL-22; SEQ ID NO. 1) или его вариант.
5. Производное по п. 4, в котором вариант:
 - (i) представляет собой замещенную форму hIL-22;
 - (ii) замещен в положениях 1, 21, 35, 64, 113 и/или 114 hIL-22;
 - (iii) содержит замену hIL-22, выбранную из группы, состоящей из A1C, A1G, A1H, N21C, N21D, N21Q, N35C, N35D, N35H, N35Q, N64C, N64D, N64Q, N64W, Q113C, Q113R, K114C и K114R и/или
 - (iv) содержит остаток Cys в положении 1 hIL-22.
6. Производное по п. 4 или п. 5, в котором вариант:
 - (i) представляет собой расширенную форму hIL-22;
 - (ii) содержит N-концевой пептид;
 - (iii) содержит N-концевой тример; и/или
 - (iv) содержит N-концевой G-P-G.
7. Производное по любому из пп. 2-6, в котором линкер содержит:
 - (i) одну или более аминокислот, необязательно включая Glu и/или Lys;
 - (ii) звено оксиэтиленглицина или несколько связанных звеньев оксиэтиленглицина, необязательно 2-5 таких звеньев;
 - (iii) один или более остатков олиго(этиленгликоля) (OEG);

- (iv) группу этилендиамина (C₂DA);
 - (v) ацетамидную (Ac) группу;
 - (vi) γ Glu-OEG-OEG-C₂DA-Ac;
 - (vii) γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu-OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac; и/или
 - (viii) γ Glu-OEG-OEG- ϵ Lys- α Ac
8. Производное по любому из пп. 2-6, в котором линкер:
- (i) представляет собой Cys-реактивный линкер, присоединенный к остатку Cys в hIL-22 или его варианте;
 - (ii) присоединен в положении -7, -5, 1, 6, 33, 113, 114 или 153 hIL-22 или его варианта;
 - (iii) присоединен к остатку Cys, замещенному в положении 1, 6, 33, 113 или 114 hIL-22;
 - (iv) присоединен к остатку Cys в положении -5, -7 или 153 относительно hIL-22; и/или
 - (v) присоединен к остатку Cys в положении 1 hIL-22.
9. Производное по любому из предшествующих пунктов, в котором производное содержит двухосновную кислоту C14, C16, C18 или C20, ковалентно присоединенную линкером к варианту hIL-22, где вариант содержит N-концевой G-P-G и остаток Cys в положении 1 hIL-22 и линкер необязательно присоединен к указанному остатку Cys.
10. Производное по любому из предшествующих пунктов, в котором производное представляет собой производное 1-10, как указано в данном документе.
11. Способ получения производного по любому из предшествующих пунктов, включающий ковалентное присоединение жирной кислоты к белку IL-22.
12. Фармацевтическая композиция, содержащая производное по любому из пп. 1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.
13. Производное по любому из пп. 1-10 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в терапии.
14. Производное по любому из пп. 1-10 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в способе лечения метаболического, печеночного, легочного, кишечного, почечного или кожного заболевания, расстройства или состояния.
15. Производное или фармацевтическая композиция по п. 14, в которых:
- (i) метаболическое заболевание, расстройство или состояние представляет собой ожирение, диабет 1 типа, диабет 2 типа, гиперлипидемию, гипергликемию или гиперинсулинемию;

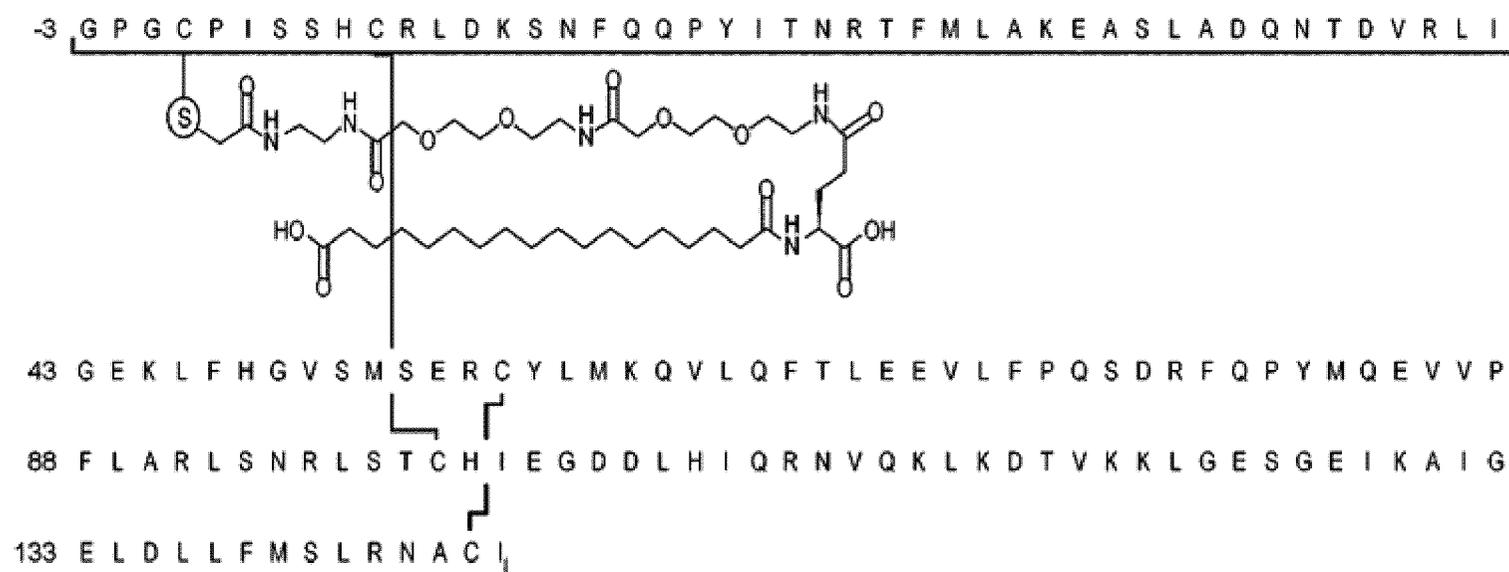
- (ii) заболевание, нарушение или состояние печени представляют собой неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), цирроз печени, алкогольный гепатит, острую печеночную недостаточность, хроническую печеночную недостаточность, острую хроническую печеночную недостаточность (ОХПН), индуцированную ацетаминофеном гепатотоксичность, острое поражение печени, склерозирующий холангит, билиарный цирроз или патологическое состояние, вызванное хирургическим вмешательством или трансплантацией;
- (iii) легочное заболевание, расстройство или состояние представляет собой хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), кистозный фиброз, бронхоэктазы, идиопатический легочный фиброз, острый респираторный дистресс-синдром, химическое повреждение, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию или грибковую инфекцию;
- (iv) заболевание, расстройство или состояние кишечника представляет собой воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), язвенный колит, болезнь Крона, болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ), химическое повреждение, вирусную инфекцию или бактериальную инфекцию;
- (v) заболевание почек, расстройство или состояние представляет собой острое заболевание почек или хроническое заболевание почек; или
- (vi) кожное заболевание, расстройство или состояние представляет собой рану, воспалительное заболевание или БТПХ.



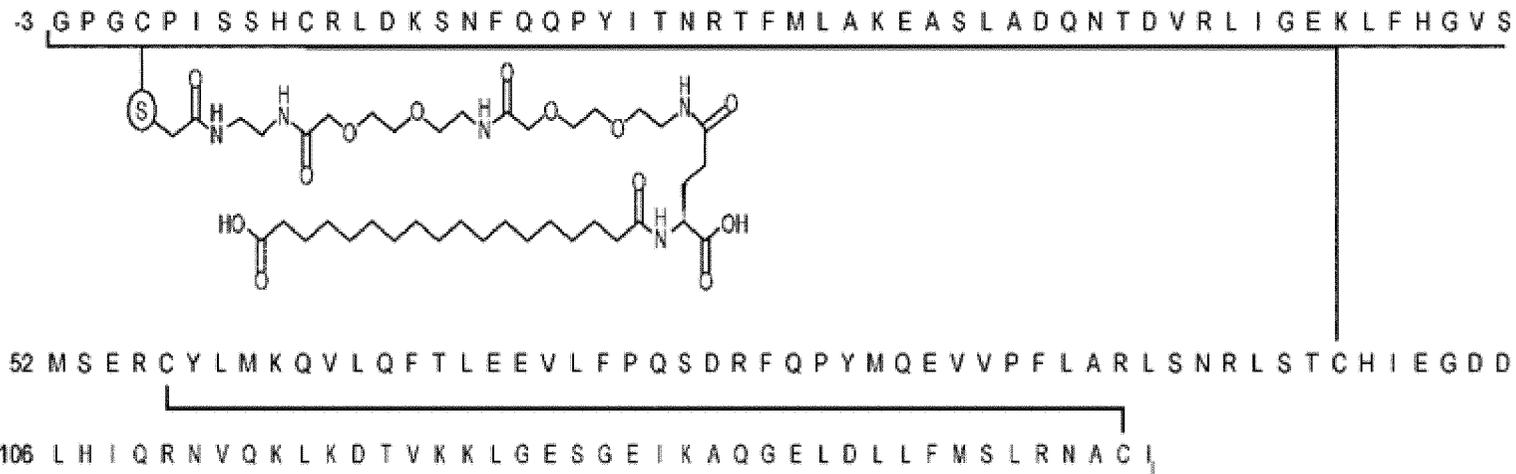
ФИГ. 1



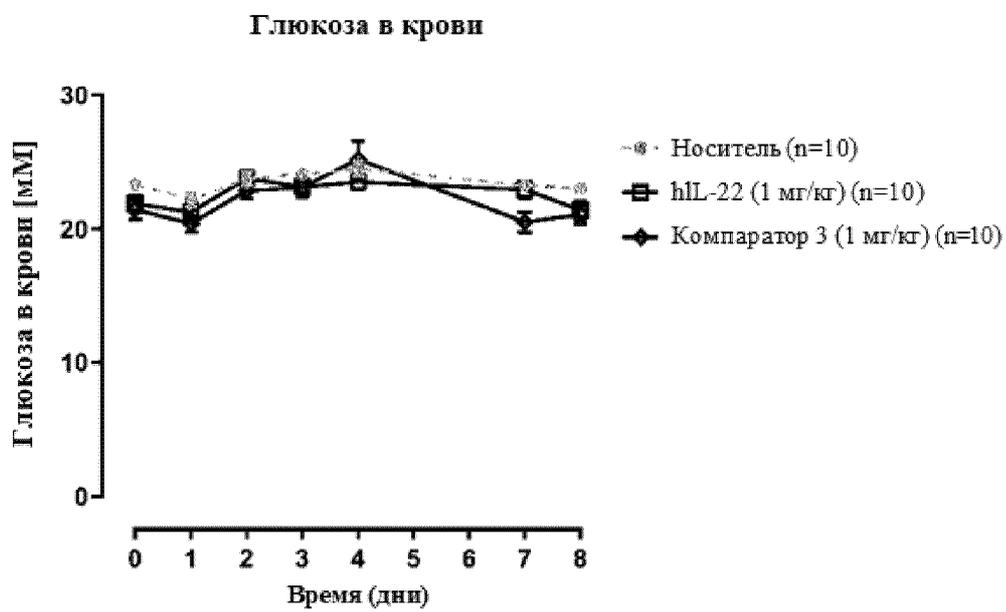
Фиг. 2



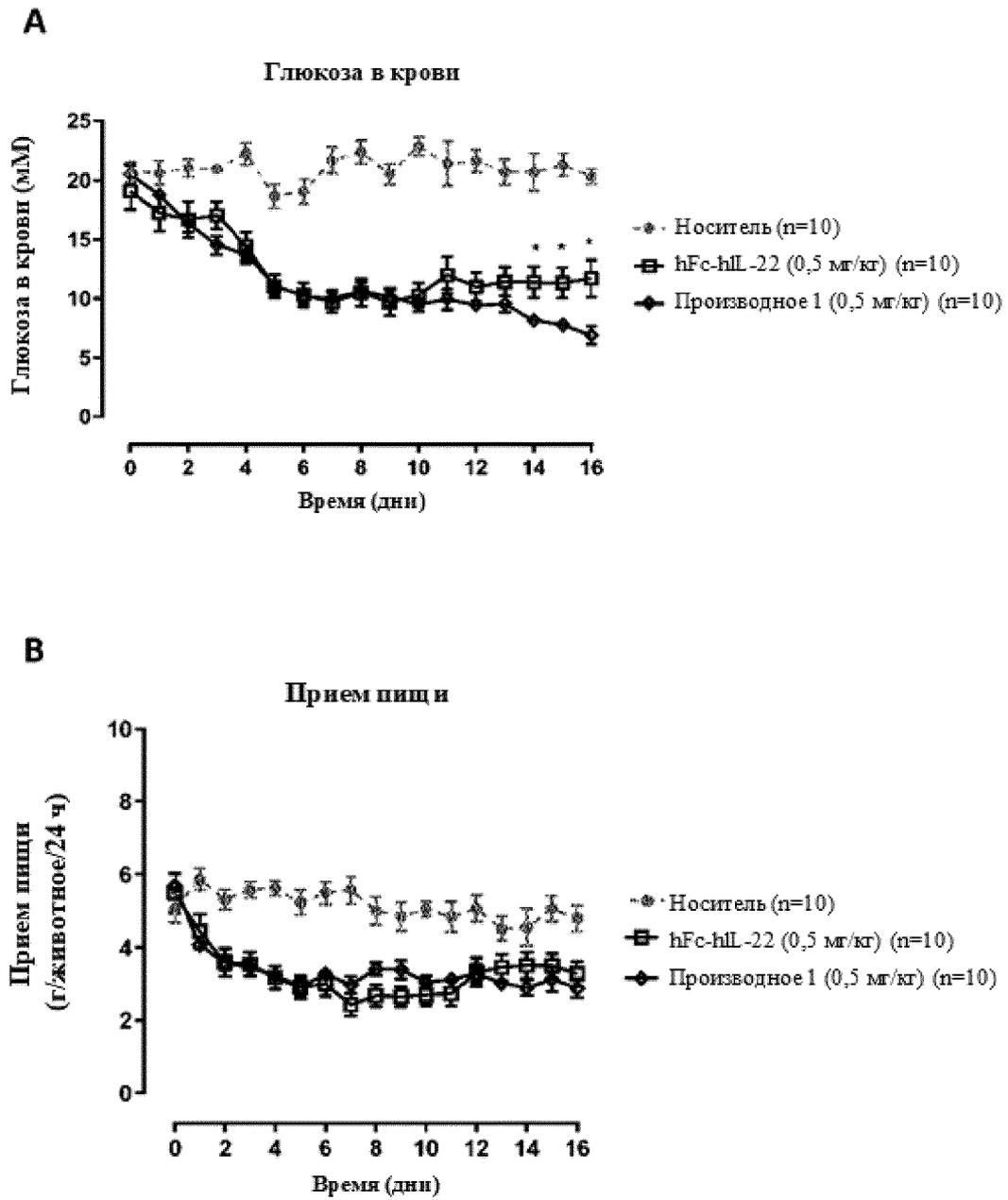
Фиг. 3



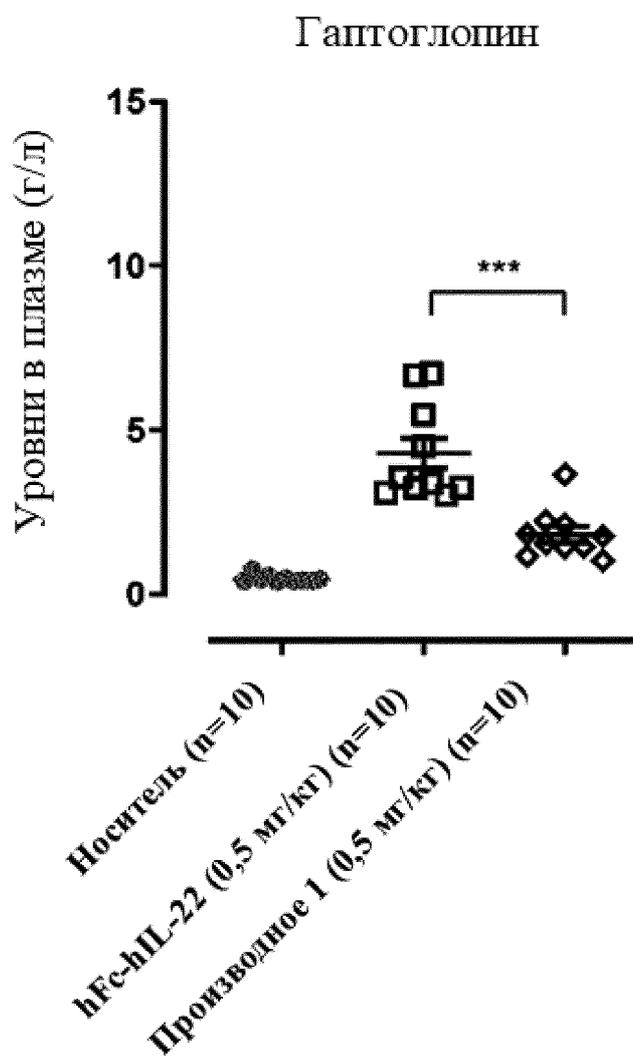
Фиг. 4



ФИГ. 5

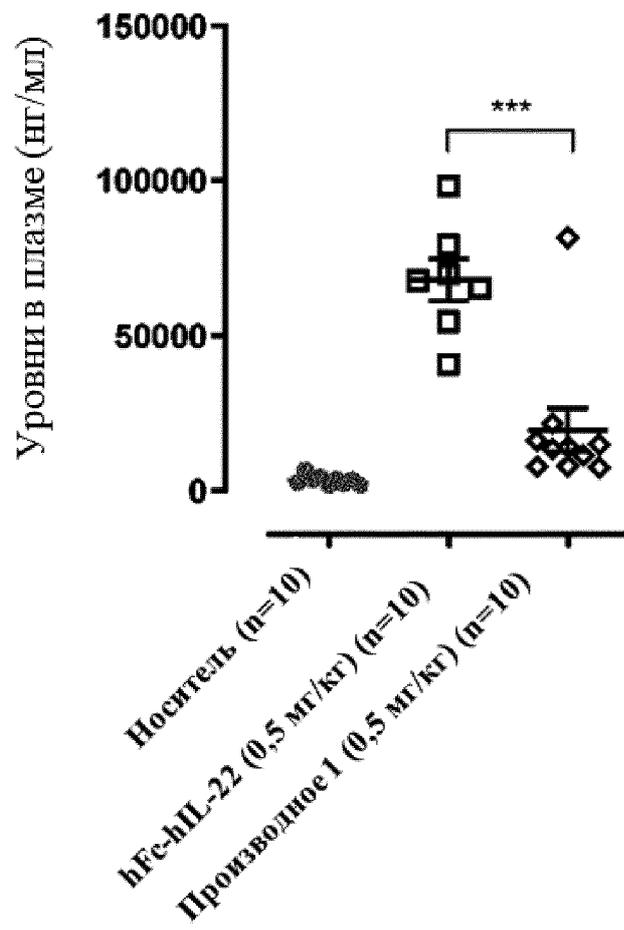


Фиг. 6

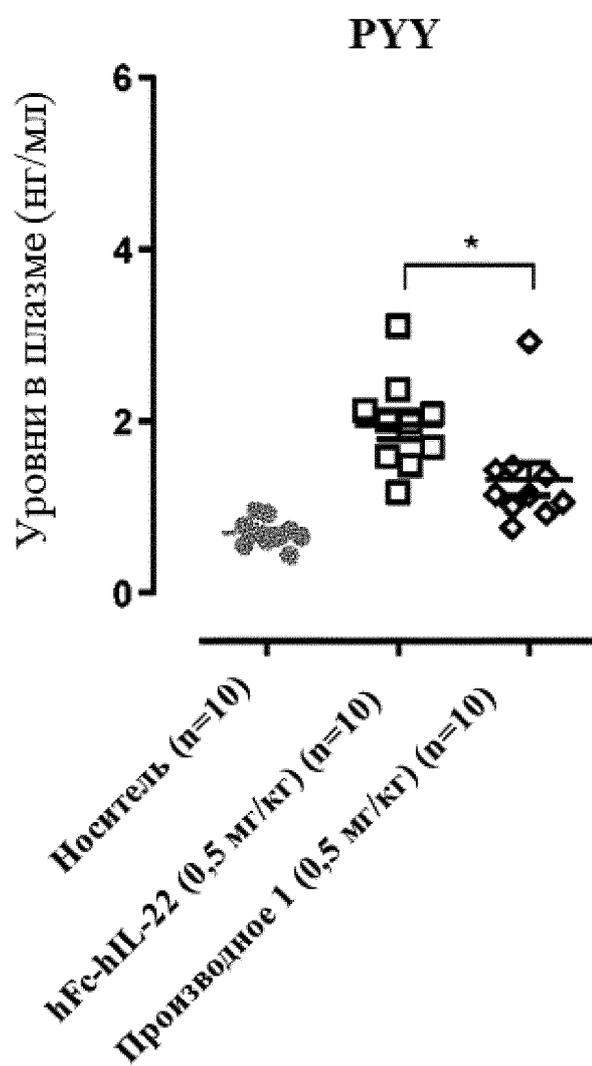


Фиг. 7А

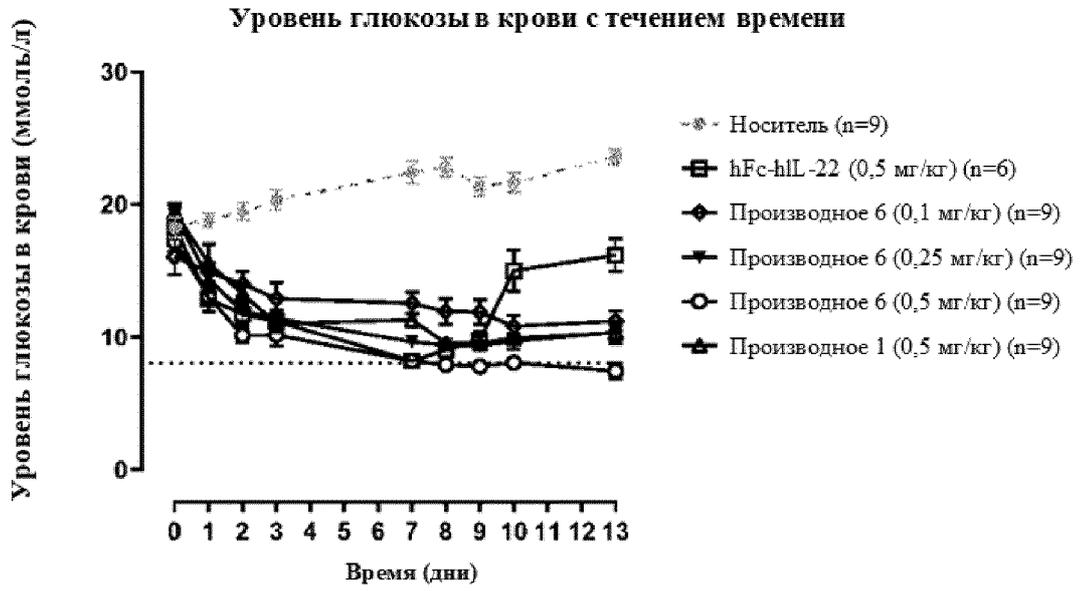
Сывороточный амилоидный белок (SAP)



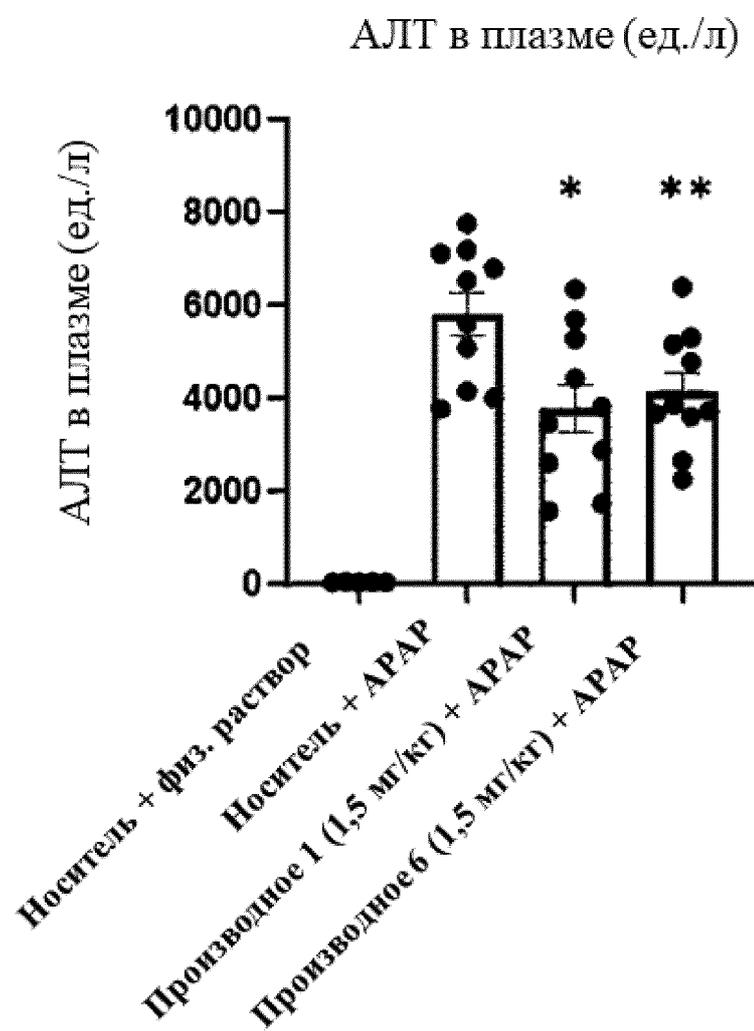
Фиг. 7В



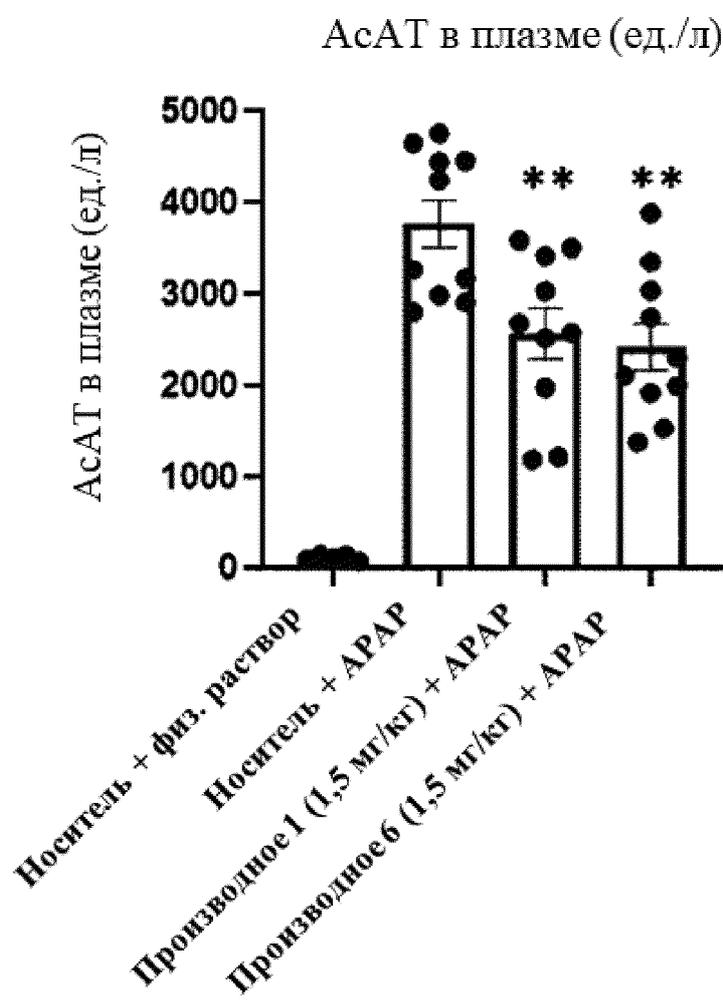
Фиг. 7С



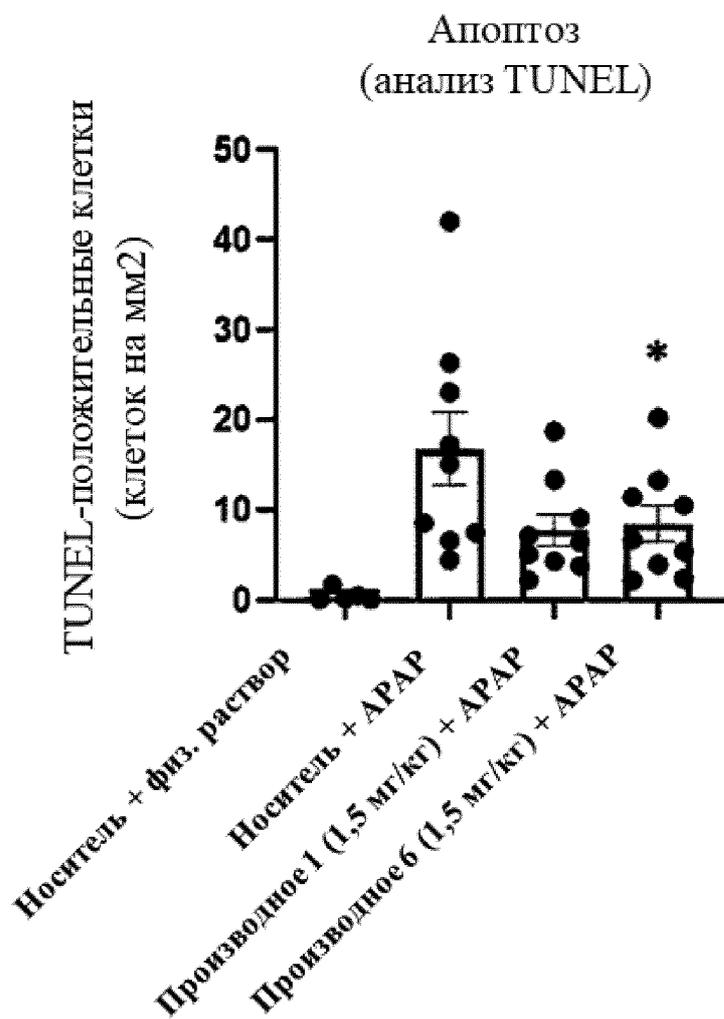
Фиг. 8



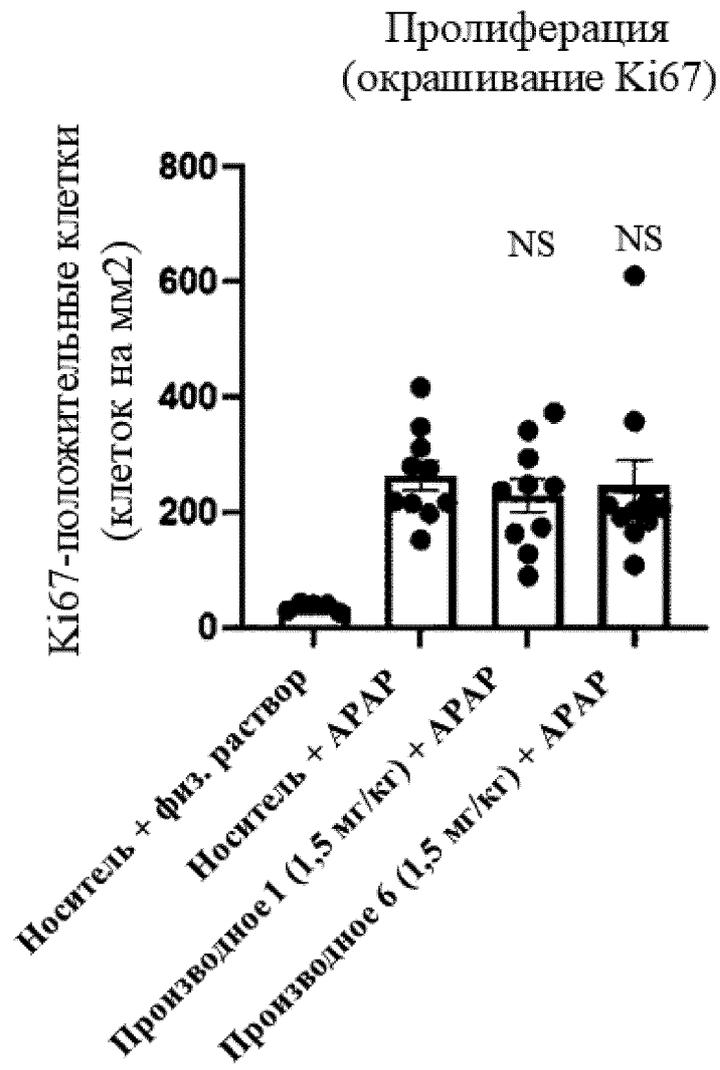
Фиг. 9А



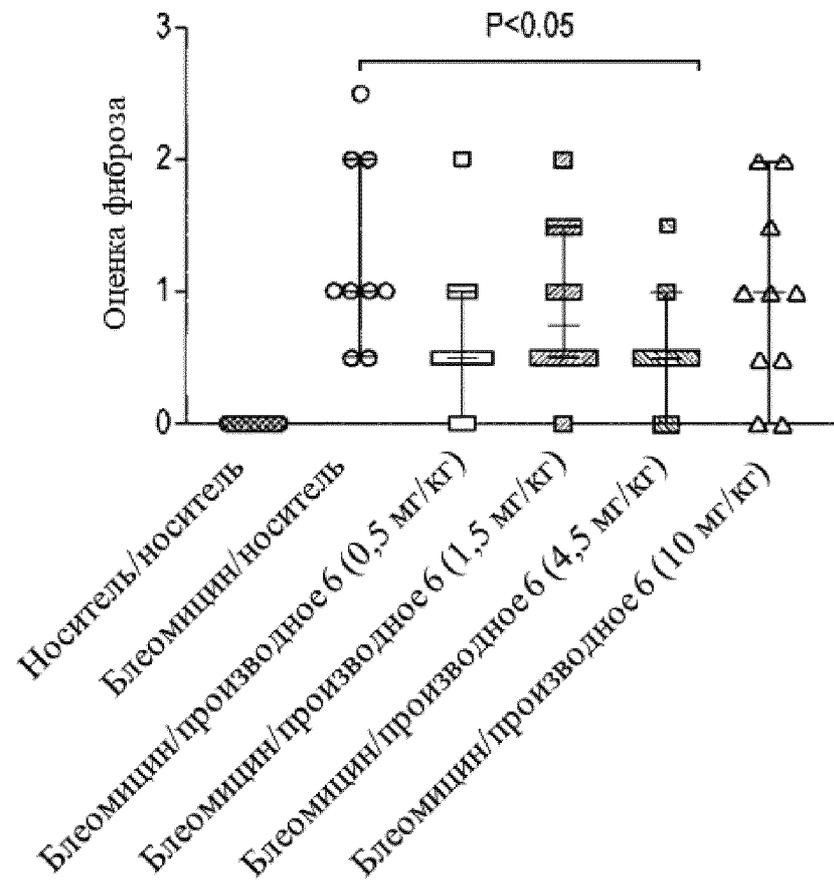
Фиг. 9В



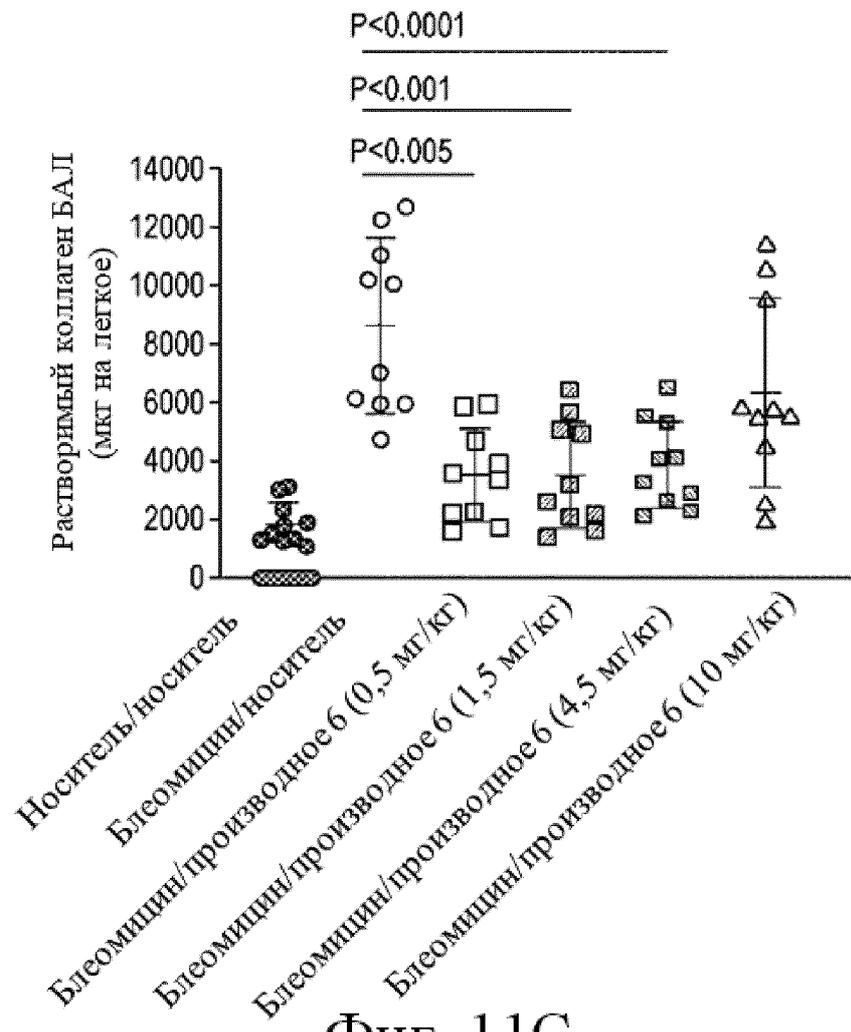
Фиг. 10А



Фиг. 10В

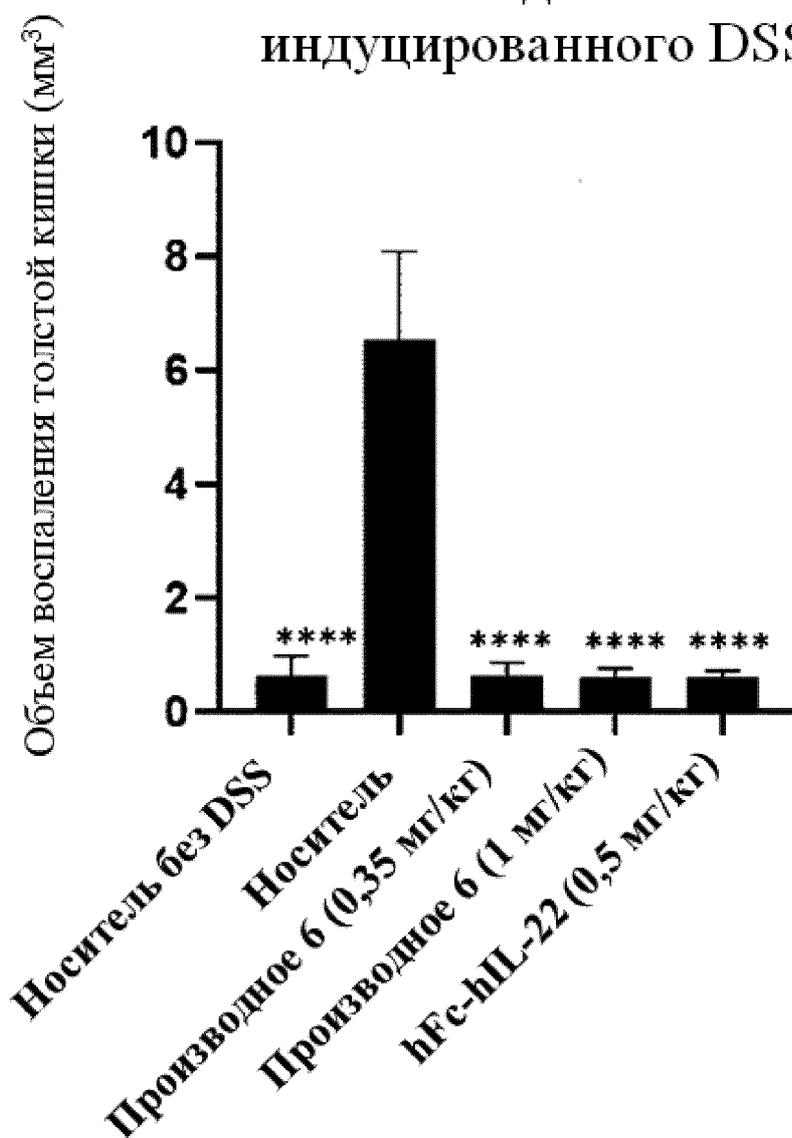


Фиг. 11В



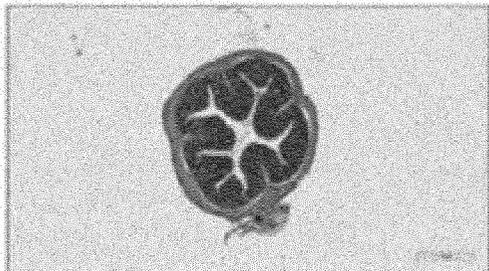
Фиг. 11С

Объем воспаления толстой кишки в модели колита, индуцированного DSS



Фиг. 12

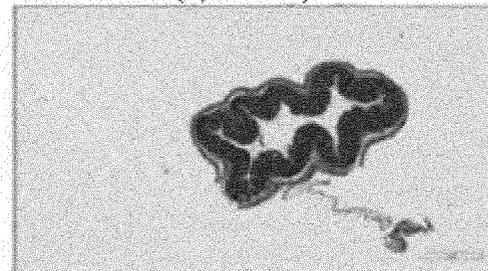
Носитель без DSS



Носитель



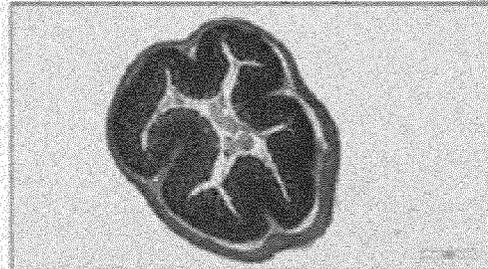
hFc-hIL-22 (0,5 мг/кг)



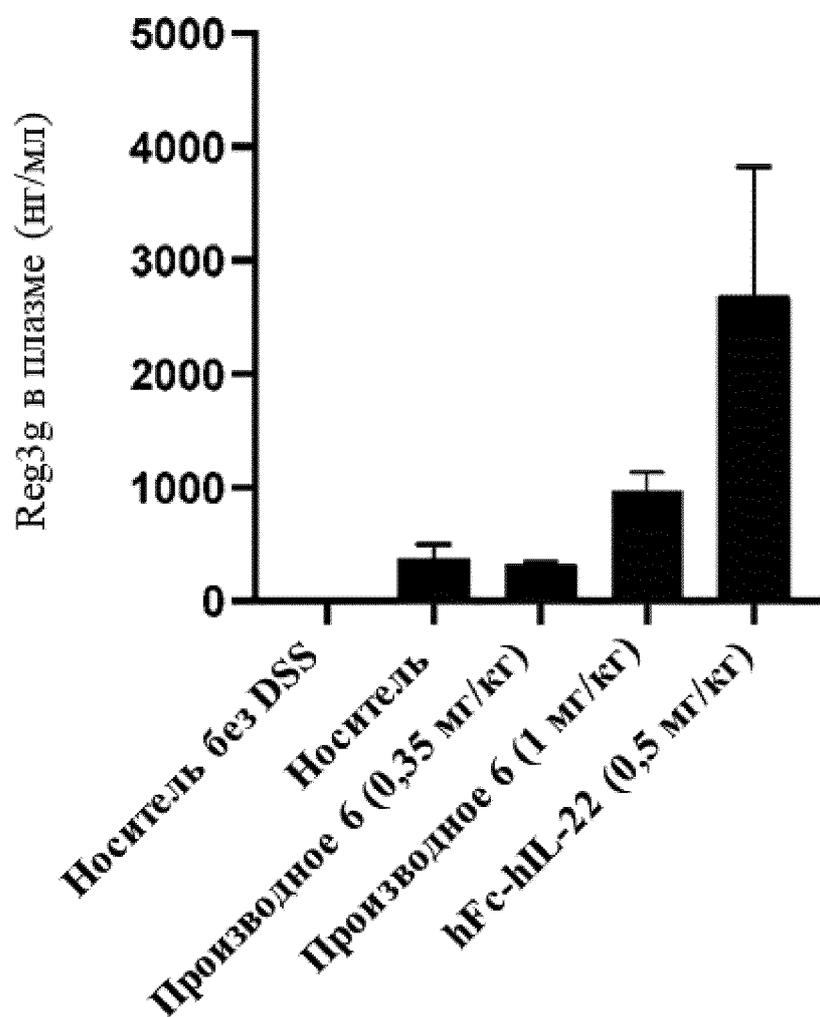
Производное 6 (0,35 мг/кг)



Производное 6 (1 мг/кг)

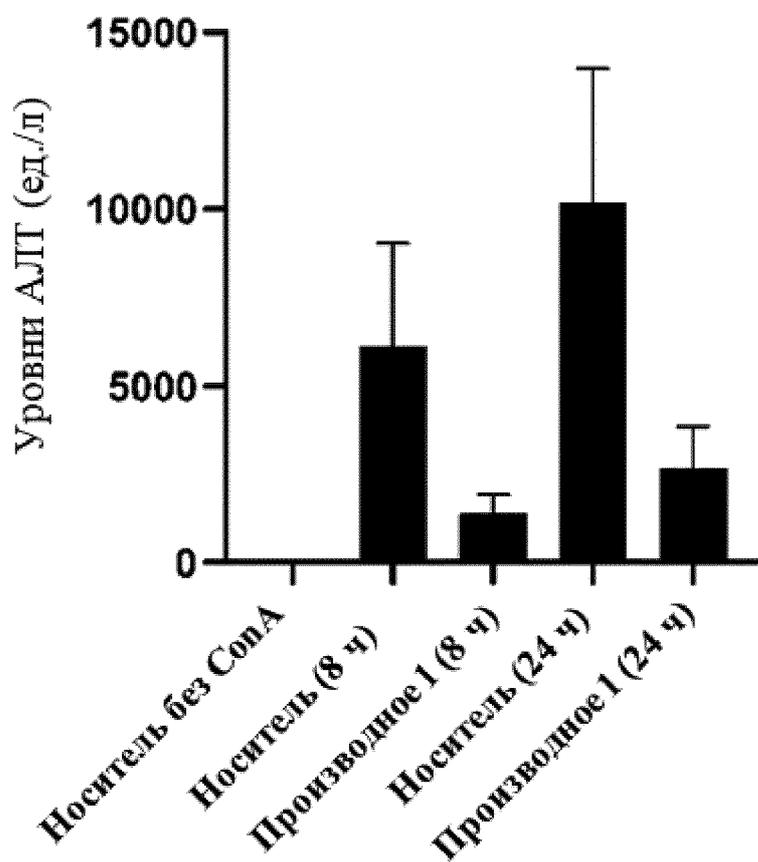


Фиг. 13



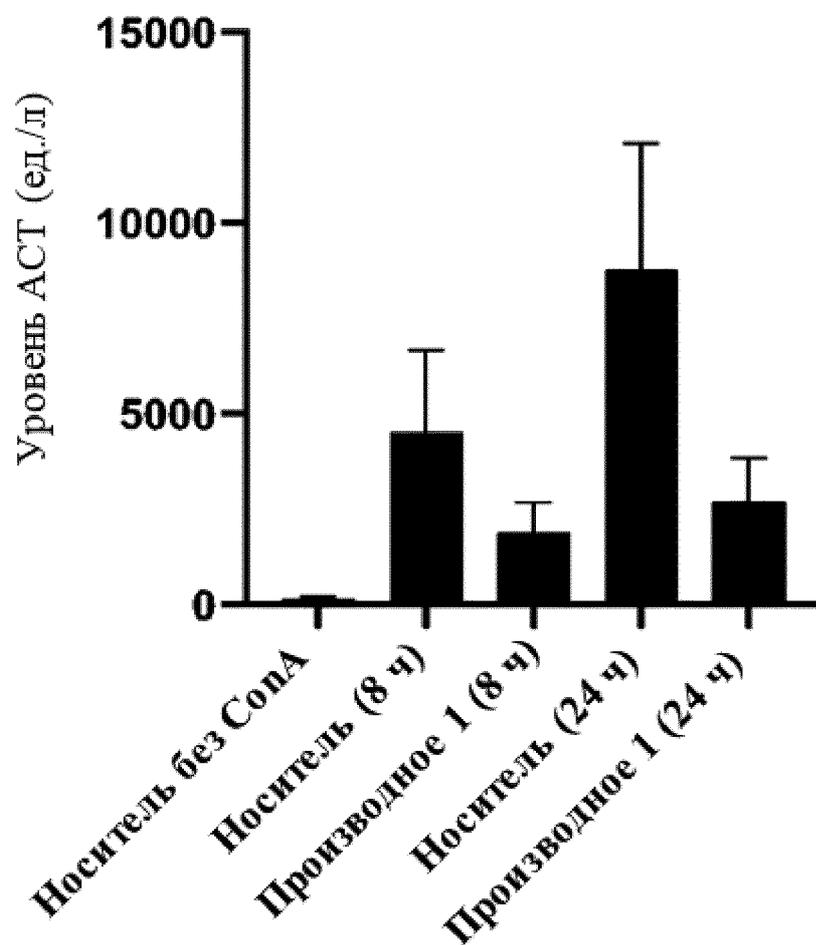
Фиг. 14

Уровни АЛТ через 8 или 24 часа после введения ConA

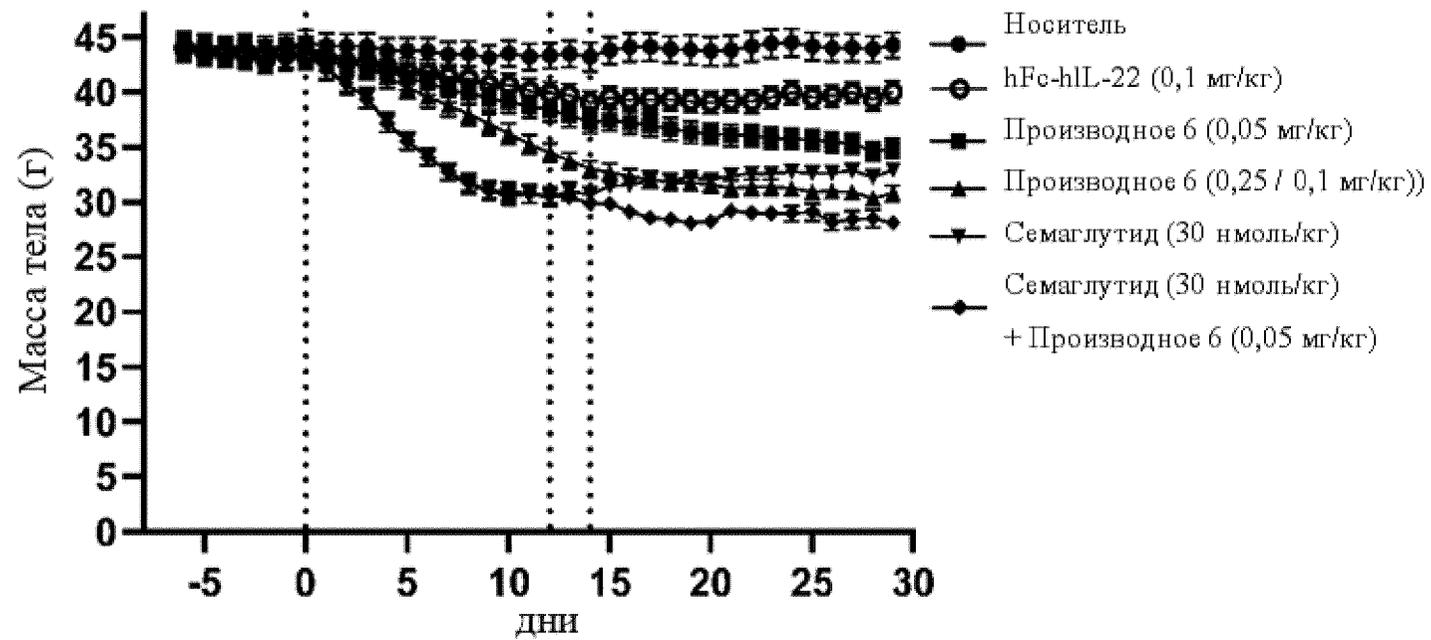


Фиг. 15А

Уровни АСТ через 8 или 24 часа после введения СоnА



Фиг. 15В



Фиг. 16