

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991175 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(51) Int. Cl. A61K 38/21 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.12.20

(54) ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ ИНТЕРФЕРОНА-ЛЯМБДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗА

(31) 1621728.3

(32) 2016.12.20

(33) GB

(86) PCT/EP2017/083949

(87) WO 2018/115199 2018.06.28

(71) Заявитель:

ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE); ФАЙВ
ПРАЙМ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Джонсон Тимоти Скотт, Твомей Бреда
(GB), Пауэрс Джанин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения фиброза. В описании описано новое исследование, которое демонстрирует, что интерферон-лямбда обладает противофиброзными эффектами прямого действия как *in vitro*, так и *in vivo* и может использоваться для обеспечения эффективных новых способов терапии для лечения множества типов фиброза.

A1

201991175

201991175

A1

ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ ИНТЕРФЕРОНА-ЛЯМБДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗА

Настоящее изобретение относится к способам лечения фиброза. Изобретение касается нового исследования, которое демонстрирует, что интерферон-лямбда обладает противофиброзными эффектами прямого действия как *in vitro*, так и *in vivo*, и его можно использовать для предоставления новых способов терапии для лечения множества типов фиброза.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фибротические заболевания представляют собой заболевания, которые характеризуются аберрантным ответом заживления раны, при котором в органе или ткани образуется избыток фиброзной соединительной ткани. Отложение и накопление избытка компонентов внеклеточного матрикса (ЕСМ), таких как коллаген и фибронектин, приводит к уплотнению и рубцеванию тканей, вызывая патологическое ремоделирование органа, и может в конечном итоге привести к недостаточности органа.

Повреждение солидных органов, как правило, начинается с эндотелиального повреждения, агрегации и активации тромбоцитов, инициирующих воспалительный ответ с инфильтрацией нейтрофилов, макрофагов, эозинофилов и лимфоцитов в область раны. Инфильтрирующиеся воспалительные клетки и пораженные эпителиальные клетки секретируют различные факторы роста и цитокины, которые служат для дальнейшего усиления воспалительного ответа. Молекулы, такие как TGF- β , PDGF и IL-13, активируют макрофаги и обеспечивают привлечение, пролиферацию и активацию фибробластов в область раны. Активированные фибробласты или миофибробласты характеризуются экспрессией гладкомышечного α -актина и секретируют коллаген и другие компоненты ЕСМ, стабилизируя подстилающий клеточный слой. Это позволяет пролиферации и миграции эпителиальных и эндотелиальных клеток на временном матриксе регенерировать поврежденную ткань. После завершения воспалительный процесс прекращается, в то время как фибробласты претерпевают апоптоз, что приводит к прекращению

ответа на рану.

При фибротическом ремоделировании длительное поражение или повреждение ткани или нарушение каскада репарации приводит к ненадлежащему ответу на рану. Происходит избыточное отложение и свертывание коллагена и ЕСМ, что приводит к избыточному накоплению ЕСМ выше нормальных потребностей, которое ассоциировано с длительной активацией миофибробластов, повреждением эпителиальных клеток и утратой нормальной архитектуры ткани.

Фибротические заболевания могут поражать любой орган или ткань, например почку, легкое, кишечник, кожу или печень. Причина фибротического заболевания может зависеть от вовлеченного органа или ткани и остается неизвестной при некоторых заболеваниях, таких как идиопатический фиброз легких. При других типах интерстициального заболевания легких причина известна, такая как воздействие аллергенов внешней среды, которые вызывают гиперчувствительный пневмонит. Фиброз печени и в конечном итоге цирроз являются результатом хронического повреждения печени, поддерживаемого посредством воздействия различных факторов, включающих факторы внешней среды и пищевые факторы, или инфекционные агенты. Длительное чрезмерное употребление алкоголя или рацион с высоким содержанием жиров/сахара также могут приводить к циррозу печени. Аналогично, диабет, гипертензия, воздействие токсических средств и различных типов аутоиммунных заболеваний могут повреждать почки, вызывая фибротическое ремоделирование и утрату функции. Многие типы воспалительных заболеваний кишечника, такие как болезнь Крона или брюшные афты, могут приводить к фибротическому ремоделированию, вызывающему стриктуры и/или мальабсорбцию.

Лечение прогрессирующего фиброза осуществляется в основном путем лечения основного заболевания, например, контроля кровяного давления, улучшения контроля уровня глюкозы при диабете или устранения повреждающего аллергена или внешнего этиологического фактора. Однако у многих пациентов после начала фибротического ремоделирования заболевание становится самоподдерживающимся и простое усовершенствование терапии

инициирующего заболевания не останавливает процесс. Некоторые фибротические заболевания можно лечить с использованием противовоспалительных и иммуносупрессивных средств, однако они являются эффективными только у некоторых подгрупп пациентов и замедляют, а не останавливают, заболевание.

На сегодняшний день существует только 2 проверенных способа терапии фибротического ремоделирования, и оба из них лицензированы только для применения при идиопатическом фиброзе легких (IPF). Пирфенидон представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, которое было одобрено для применения для лечения IPF в Японии в 2008 году и в Европе в 2011 году, которое, вероятно, действует через множество механизмов действия, которые не полностью понятны, но отчасти он может действовать через подавление TGF- β . Нинтеданиб представляет собой ингибитор три-ангиокиназы, блокирующей тирозинкиназную активность рецепторов VEGF, FGF и PDGF. Оба соединения замедляют развитие IPF, но, вероятно, только могут продлить жизнь на вплоть до 2 лет, исходя из текущих исследований. Кроме того, оба из них ассоциированы со значительными побочными эффектами, так что более 30% пациентов не могут переносить их длительное применение. На сегодняшний день отсутствуют одобренные направленные способы терапии для фибротических показаний.

Таким образом, в настоящее время существует неудовлетворенная медицинская потребность в усовершенствованном способе лечения фибротического заболевания во всех органах. Таким образом, задачей настоящего изобретения является предоставление нового способа лечения фиброза.

Открытие и первоначальное описание семейства интерферона- λ (IFN- λ) в 2003 году открыло новую перспективную главу в области исследований IFN. Существует 4 различных, но высоко родственных белка, обозначаемых как IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 и IFN- λ 4. Эти белки также известны как интерлейкин-29 (IL-29), IL-28A, IL-28B и IFNL4, соответственно. В совокупности, эти 4 цитокина составляют подгруппу IFN типа III. Они отличаются от IFN как типа I, так и II, по ряду причин, включая тот факт, что они

передают сигнал через гетеродимерный рецепторный комплекс, который отличается от рецепторов, используемых IFN типа I или типа II. Хотя IFN типа I (IFN- α /b) и IFN типа III (IFN- λ) передают сигнал через различные рецепторные комплексы, они активируют один и тот же внутриклеточный каскад передачи сигнала и имеют многие одинаковые виды биологической активности, включая противовирусную активность, в широком множестве клеток-мишеней. В соответствии с противовирусной активностью, экспрессия генов IFN- λ и их соответствующих белков индуцируется инфекцией множеством типов вирусов. Таким образом, экспрессия IFN типа III (IFN- λ) и их основная биологическая активность являются в высокой степени сходными с IFN типа I. Однако, в отличие от рецепторов IFN- α , которые широко экспрессируются на большинстве типов клеток, включая лейкоциты, рецепторы IFN- λ по большей части ограничены клетками эпителиального происхождения. Потенциальная клиническая важность IFN- λ в качестве нового противовирусного терапевтического средства уже очевидна. Кроме того, доклинические исследования, проведенные несколькими группами, указывают на то, что IFN- λ также может быть полезным в качестве потенциального терапевтического средства против определенных типов злокачественной опухоли.

В рамках настоящего изобретения авторы описывают новое исследование, которое впервые демонстрирует, что цитокины семейства интерферона-лямбда имеют противофибротические эффекты прямого действия как *in vitro*, так и *in vivo*, и что эти белки можно использовать для создания новых эффективных способов лечения множества типов фиброза.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Если не определено иначе, все научные и технические термины, использованные в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевает специалист в области, к которой настоящее изобретение относится. Все публикации и патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в качестве ссылок.

Будет понятно, что любые из вариантов осуществления,

описанных в настоящем описании, можно комбинировать.

Настоящее изобретение относится к интерферону-лямбда для применения для лечения фиброза. Изобретение также относится к применению интерферона-лямбда для получения лекарственного средства для лечения фиброза. Кроме того, изобретение относится к способу лечения фиброза, включающему введение терапевтически эффективного количества интерферона-лямбда.

Интерфероны (IFN) представляют собой важный класс цитокинов с разнообразными ролями в защите хозяина от вирусной инфекции и модулировании иммунного ответа. Известно три различных типа интерферонов (типы I, II и III), исходя из их структурных признаков, использования рецепторов и видов биологической активности, и их роль в защите хозяина варьируется между различными типами.

IFN типа I (IFN- $\alpha/\beta/\omega/\epsilon/\kappa$ у человека) обладают выраженной противовирусной активностью и способны индуцировать мощный противовирусный ответ в широком множестве типов клеток (Huang et al 1993). IFN- α/β связывает гетеродимерный трансмембранный рецептор, называемый IFN α R (состоящий из субъединиц IFNAR1 и IFNAR2), который при связывании с лигандом запускает активацию киназ JAK1 и TYK2, которые затем фосфорилируют определенные остатки тирозина во внутриклеточном домене рецептора. Это создает участки присоединения для сигнальных молекул STAT1 и STAT2, что приводит к их привлечению и последующему фосфорилированию. Фосфорилированные STAT привлекают IFN-регулирующий фактор 9 (IRF9), которые вместе формируют фактор 3 IFN-стимулируемых генов (ISGF3), который проникает в ядро и запускает транскрипцию IFN-стимулируемых генов (ISG).

Класс типа II включает только IFN- γ , который классифицируют как цитокин Th1-типа, который стимулирует клеточно-опосредуемые иммунные ответы, важные для защиты хозяина от патогенных микроорганизмов, таких как *Mycobacterium tuberculosis* (Bach et al 1997), имеет центральную роль в противоопухолевом иммунитете и усиливает противовирусную активность IFN типа I. Таким образом, IFN типа I и типа II действуют вместе, активируя как

врожденный, так и адаптивный иммунный ответ, с целью защиты хозяина от инфекции и инвазии опухоли (Biron et al 2001).

IFN являются частью более крупного семейства цитокинов класса II, который включает шесть родственных IL-10 цитокинов: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 и IL-26 (Kotenko 2002), и их относят к одному классу, поскольку они передают сигнал через рецепторы, которые имеют общие мотивы в их внеклеточных доменах. Эти рецепторы включают семейство рецепторов цитокинов класса II (CRF2) и, как правило, представляют собой гетеродимеры, состоящие из 2 различных рецепторных цепей: рецепторных субъединиц α и β (Stahl et al. 1993). Как правило, α -субъединицы представляют собой основные цитокин-связывающие белки, а β -субъединицы требуются для формирования высокоаффинных участков связывания и для передачи сигнала.

IFN типа III или IFN- λ являются самым последним добавлением к семейству CRF2. Они демонстрируют структурные признаки родственных IL-10 цитокинов и индуцируют противовирусную активность в более ограниченной клеточной популяции, чем IFN типа I, а именно, в эпителиальных клетках и определенных иммунных клетках (Kotenko et al, 2003; Sheppard et al, 2003). У человека, семейство IFN типа III состоит из 4 близкородственных белков: IFN- $\lambda 1$, - $\lambda 2$, - $\lambda 3$ и - $\lambda 4$ (также известные как IL-29, IL-28A, IL-28B и IFNL4, соответственно), в то время как мышь имеет только IFN- $\lambda 2$ и - $\lambda 3$ (IL-28A и IL-28B, соответственно). Они являются высокоомологичными; идентичность аминокислот между IFN- $\lambda 2$ и IFN- $\lambda 3$ составляет ~96% и идентичность между IFN- $\lambda 1$ и IFN- $\lambda 2/\lambda 3$ составляет ~81%. IFN- $\lambda 4$ в наибольшей степени сходен с IFN- $\lambda 3$, однако эти белки обладают только ~30% идентичностью, и IFN- $\lambda 4$ в основном является внутриклеточным и секретируется у человека на очень низком уровне (Hong et al 2016).

Рецепторный комплекс IFN- λ состоит из специфической цепи 1 рецептора IFN- λ (IFN- $\lambda R1$ или IL-28RA) и общей цепи 2 рецептора IL-10 (IL-10R2 или IL-10R β). Связывание рецепторного комплекса IFN- λ любым из четырех лигандов приводит к активации JAK1 и TYK2,

активации факторов транскрипции STAT1, STAT2 и IRF9 с образованием фактора 3 IFN-стимулируемых генов (ISGF3). ISGF3 регулирует транскрипцию генов путем связывания с IFN-стимулируемыми элементами (ISRE) в промоторах нескольких сотен IFN-стимулируемых генов (ISG), которые включают ряд генов, которые ассоциированы с противовирусным фенотипом, включая *OAS1*, *MX1*, *EIF2AK2* (двухцепочечная РНК-активируемая протеинкиназа) и IRF7. Сравнительные анализы на кДНК-микрочипах показали, что репертуар генов, которые индуцируются IFN типа III (IFN- λ) является по существу таким же, как и гены, индуцируемые IFN типа I (IFN- α/β) (Doyle et al 2006). В заключение, несмотря на использование различных рецепторов, IFN как типа I, так и типа III, активируют ISGF3 (Zhou et al 2007), и таким образом, индуцируют сходные транскрипционные ответы.

Даже несмотря на то, что профиль экспрессии генов, индуцируемой IFN либо типа I, либо типа III, является в высокой степени сходным, относительная величина экспрессии генов, индуцируемой IFN- α часто превышает величину экспрессии, индуцируемую IFN- λ . Это может отражать различия в относительной силе передачи сигнала через рецепторы типа I относительно типа III или может просто отражать различия в уровнях экспрессии соответствующих рецепторов для этих лигандов.

Кристаллическая структура IFN- λ демонстрирует структуру четырехспирального пучка, типичную для цитокинов класса II, причем наиболее близким структурным гомологом IFN- λ является IL-22 (Gad et al 2009), и это может указывать на то, что IFN- λ и IL-22 обладают параллельными функциями, защищающими эпителиальную ткань от вирусных и бактериальных инфекций, соответственно. Участок связывания на цепи рецептора IFN- λ R1 является в высокой степени консервативным среди всех четырех IFN- λ , в то время как участок связывания на IL-10R2 точно не определен (Miknis et al 2010). IFN- λ R1 состоит из двух отдельных доменов фибронектина типа III приблизительно из 100 аминокислот каждый. Поверхность контакта лиганд-рецептор включает спираль A, петлю AB и спираль

F на участке IFN, а также петли, в основном из N-концевого домена и междоменной шарнирной области IFN- λ R1. Связывание между лигандом и рецептором поддерживает первоначальное ионное взаимодействие в длинном диапазоне, опосредуемое водородными связями, после которого следуют гидрофобные взаимодействия для завершения совмещения.

IFN- λ экспрессируются различными кроветворными клетками и эпителиальными клетками в ответ на вирусную инфекцию. Распознающие паттерн рецепторы, которые обнаруживают вторгшийся вирус на эпителиальной поверхности слизистой оболочки, инициируют транскрипционный ответ через факторы транскрипции NF- κ B, IRF3, IRF7 и Med23 (Osterlund et al 2007, Griffiths et al 2013). Показано, что роль IFN типа I и типа III в опосредовании противовирусной защиты на поверхностях слизистых оболочек является как избыточной, так и уникальной, в зависимости от вируса и точки проникновения. Эпителиальные клетки кишечника отвечают исключительно на IFN типа III, который опосредует контроль эпителиотропных вирусов, таких как ротавирусы, неизбыточным образом (Pott et al 2011). Реовирусы инициируют их инфекцию в эпителии кишечника, но могут проникать в эпителиальный слой кишечника, вызывая системную инфекцию у мышей; IFN типа III ограничивает исходную репликацию в эпителии кишечника, однако IFN типа I необходим для предотвращения системной инфекции (Mahlakoiv et al 2015). Компартиментализация IFN типа I и III является менее выраженной в дыхательных путях, где существует некоторая степень избыточности между двумя системами IFN (Mordstein et al 2008). Таким образом, эпителий дыхательных путей экспрессирует рецепторы для обоих типов IFN, в то время как эпителий кишечника экспрессирует только рецепторы IFN- λ .

Экспрессия рецепторов IFN- λ R1 ограничивается в основном эпителиальными клетками и определенными подгруппами иммунных клеток, таких как макрофаги моноцитарного происхождения, плазмацитоидные дендритные клетки и NK-клетки в определенных случаях. Активация IFN- λ R1 в NK-клетках связана с максимальной

продукцией IFN- γ и противоопухолевой активностью, которая может быть эффектом, опосредуемым синергично с другими стимулами или в комбинации с другими типами клеток (Souza-Fonseca-Guimaraes et al 2015). Вследствие ограниченной экспрессии IFN- λ R1 иммунными клетками и эпителиальными клетками, иммуномодулирующие эффекты IFN типа III ограничены, но они являются очень эффективными противовирусными средствами, когда местный ответ слизистой оболочки является достаточным для контроля вируса. Это контрастирует с повсеместной активностью IFN типа I в ходе ответов на инфекцию и, таким образом, является более пригодным для контроля тяжелой или системной инфекции, когда необходима широко распространенная иммунная активация.

В следующих ссылках описаны различия в передаче сигнала и биологических эффектах между интерферонами типа I и типа III: Wack et al 2015, Chow & Gale 2015, Hemann et al 2017, Broggi et al 2017, Blumer et al 2017, Chiriac et al 2017, Bhushal et al 2017, Andreacos et al 2017, и Bhushal et al 2017.

Вклад IFN- λ в противовирусную терапию хорошо определен, причем доступны данные в доклинических моделях на мышах и шимпанзе и *in vitro*, в первичных гепатоцитах человека, инфицированных вирусом гепатита C (HCV) (Thomas et al 2012, Park et al 2012) и в клинических испытаниях у человека (данные PhII BMS). Диапазон вирусов, на которые может нацеливаться IFN- λ , включают, но не ограничиваются ими, следующие: вирус гриппа A/B, вирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS), коронавирус, H1N1, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус простого герпеса 2 типа (HSV2), цитомегаловирус (CMV), вирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром (MERS), норовирус, ротавирус и вирус Эбола (Eslam and George 2015; Gresser 2015). Все из этих вирусов нацелены на эпителиальную точку входа и терапевтически на них может быть осуществлено нацеливание с помощью IFN- λ , который может активировать рецепторный комплекс IFN- λ R1 в этой точке доступа.

Многочисленные доклинические исследования продемонстрировали, что IFN- λ обладают противоопухолевой

активностью при ряде типов опухолей, таких как гепатома, меланома, карцинома пищевода, нейроэндокринные опухоли, карцинома ободочной и прямой кишки, аденокарцинома легкого и лимфома Беркитта (Sato et al 2006, Zitzmann et al 2006, Steen et al 2010). Противоопухолевые механизмы IFN- λ представляют собой индукцию апоптоза опухолевых клеток и прямой эффект на иммунные клетки, для способствования как врожденной, так и адаптивной активности стимуляции иммунитета. IFN- λ индуцируются в микроокружении опухоли, и было показано, что передача сигнала через рецептор IFN- λ R1 играет противоопухолевую роль у мышей с нокаутом IFN- λ R1, которые являются более подверженными формированию саркомы и гибели в моделях с трансплантированными опухолями. Введение IFN- λ замедляло летальность и снижало развитие саркомы (Numasaki et al 2007). В контексте лечения злокачественной опухоли IFN- λ могут рассматриваться как дополнение к существующей терапии IFN- α , ингибиторами иммунной точки контроля, или в качестве вспомогательных средств для традиционных средств против злокачественной опухоли, таких как бортезомиб, темозоломид, цисплатин или 5-FU (Guenterberg et al 2010, Li et al 2010).

Генетические и функциональные доказательства показали защитную роль IFN- λ при воспалительных заболеваниях, таких как астма, псориаз и ревматоидный артрит. В модели астмы на мышях IFN- λ минимизировал тяжесть заболевания, снижал инфильтрацию эозинофилами и демонстрировал эффект Th1-иммунного уклонения от цитокинов Th2 и Th17 (Koltsida et al 2011). В модели индуцируемого коллагеном артрита на мышях лечение IFN- λ приводило к устранению заболевания посредством подавления ответов IL-1 и IL-17, а также привлечения нейтрофилов (Blazek et al 2015). Было показано, что в псориатических очагах Th17-клетки являются источником IFN- λ , где он может подавлять Th2-цитокин IL-13 (Wolk et al 2013). Роль IFN- λ в воспалительных и аутоиммунных заболеваниях все еще является неоднозначной.

Три знаковых полногеномных исследования ассоциации (GWAS)

на HCV продемонстрировали, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в области IFN- λ являются наиболее сильным единичным прогностическим фактором как ответа на терапию пегилированным IFN- λ 1/рибавирином (PEG-IFN/RBV), так и спонтанного устранения хронической инфекции HCV. Эти SNP картированы на локусе генов IFNL3/IFNL4 и было показано, что они являются эффективными для всех генотипов HCV и во всех географических областях (Ge et al 2009, Suppiah et al 2009, Tanaka et al 2009). Роль генотипа IFNL3/IFNL4 для прогнозирования исходов лечения при всех способах противовирусной терапии (включая противовирусные лекарственные средства как первого, так и второго поколения) также распространяется на широкий перечень других вирусных инфекций, включая CMV, HSV и вирус Эпштейна-Барр (EBV), а также совместную инфекцию HCV/ВИЧ и HCV/HBV (Rallon et 2010, Guo et al 2013). Данные согласуются с основной ролью IFN- λ в контроле вирусных инфекций в различных органах, в части, в органах эпителиального происхождения.

Существуют доказательства роли двух SNP в фиброзе печени, а именно "отвечающих" генотипов rs12979860 и rs8099917, и ускорении воспаления и фиброза печени при инфекциях вирусом гепатита С и гепатита В и неалкогольной жировой инфильтрации печени (Bochud et al 2012, Eslam et al 2015).

Было описано два функциональных варианта в области IFNL3/IFNL4, которые связаны с исходным открытием GWAS, но могут быть многие другие еще не идентифицированные вносящие вклад факторы. Первым SNP является Δ G/TT (rs368234815), который контролирует продукцию IFN- λ 4, а также прогнозирует устранение HCV (Prokunina-Olsson et al 2013). Анцестральный аллель "ΔG" кодирует функциональный IFN- λ 4, который ухудшает устранение HCV и, таким образом, повышает вирусную нагрузку, в то время как более поздний (с точки зрения эволюции) аллель "TT" rs368234815 прерывает открытую рамку считывания IFNL4 (нарушая экспрессию белка) и ассоциирован с улучшенным выведением вируса. Этот кажущийся парадокс может быть связан с преимущественно внутриклеточной локализацией и низкой секрецией IFNL4, и может

указывать на то, что IFNL4 может ингибировать секрецию и, таким образом, функцию других представителей семейства IFN- λ . Второй SNP в области 3'-UTR IFNL3 (rs4803217) нарушает стабильность матричной РНК IFNL3 (McFarland et al 2014). Хотя роль этих вариантов в прогнозировании фиброза печени неизвестна, особенно в когортах без HCV, они находятся в неравновесии по сцеплению с rs12979860, так что требуется больше работы для того, чтобы показать, есть ли какая-либо ассоциация.

В общем, на сегодняшний день описано, что IFN- λ обладают противовирусной и противоопухолевой активностью, иммуновоспалительной функцией и гомеостатическими эффектами. В рамках настоящего изобретения авторы описывают, что IFN- λ неожиданно имеют противофиброзные эффекты прямого действия как *in vitro*, так и *in vivo*. В примерах продемонстрировано, что белки интерферона-лямбда обладают противофиброзными эффектами в моделях хронических заболеваний почек на мышах *in vivo* и в моделях фиброза человека *in vitro* с соответствующими первичными клетками из систем органов печени, тонкого кишечника, кожи, почек и легкого. Таким образом, эти белки обладают неожиданным потенциалом в качестве противофиброзных средств при множестве типах фиброза, и их можно использовать для создания новых эффективных способов терапии для лечения фибротических заболеваний.

Термины "интерферон-лямбда" (IFN- λ) и интерфероны-лямбда (IFN- λ) используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения цитокинов семейства интерферона-лямбда. Белки интерфероны-лямбда и рецептор интерферона-лямбда также известны под рядом других синонимов, как показано в таблице 1.

Таблица 1

белок	Синонимы
интерферон лямбда-1	IFN- λ 1 IFNL1 интерлейкин-29 IL-29

интерферон лямбда-2	IFN- λ 2 IFNL2 интерлейкин-28A IL-28A цитокин Zcyto20 ZCYTO20
интерферон лямбда-3	IFN- λ 3 IFNL3 интерлейкин-28B IL-28B ZCYTO22
интерферон лямбда-4	IFN- λ 4 IFNL4
рецептор интерферона-лямбда	IFN-LR1 IL-28R1 IL-28RA IFN- λ R1

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда представляет собой IFN- λ 1.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда представляет собой IFN- λ 2.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда представляет собой IFN- λ 3.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда представляет собой IFN- λ 4.

Аминокислотные последовательности и последовательности ДНК для IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 и IFN- λ 4 представлены на фиг.18.

IFN- λ можно использовать в форме слитого белка, такого как слитая конструкция Fc. Слитый белок Fc состоит из Fc-домена антитела (например, IgG), слитого с IFN- λ . Слитые белки Fc формируют димеры в результате ассоциации Fc-доменов. Таким образом, IFN- λ может иметь форму димера, а также форму мономера.

Функциональные миметики

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда

представляет собой функциональный миметик IFN- λ 1.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда представляет собой функциональный миметик IFN- λ 2.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда представляет собой функциональный миметик IFN- λ 3.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда представляет собой функциональный миметик IFN- λ 4.

Термин "функциональный миметик" означает молекулу, которая имеет такие же или сходные биологические эффекты с белком дикого типа. Например, функциональный миметик интерферона-лямбда может активировать рецептор интерферона-лямбда и запускать транскрипцию IFN-стимулируемых генов.

В одном варианте осуществления функциональный миметик может снижать уровни гидроксипролина в модели фиброза *in vivo*, как описано в примере 1. В одном варианте осуществления функциональный миметик может ингибировать отложение фибронектина и/или коллагена в модели фиброза *in vitro*, как описано в примере 2.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой фрагмент IFN- λ 1.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой фрагмент IFN- λ 2.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой фрагмент IFN- λ 3.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой фрагмент IFN- λ 4.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой вариант IFN- λ 1.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой вариант IFN- λ 2.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой вариант IFN- λ 3.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой вариант IFN- λ 4.

Вариант интерферона-лямбда может представлять собой или может содержать вариант одной из конкретных последовательности, представленных на фиг.18. Например, вариант может представлять собой вариант с заменой, делецией или вставкой для любой из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг.18. Фрагмент IFN- λ может иметь размер, например, более 50 аминокислот, более 100 аминокислот или более 150 аминокислот.

Вариант интерферона-лямбда может содержать 1, 2, 3, 4, 5, вплоть до 10, вплоть до 20 или более (как правило, вплоть до максимум 50) аминокислотных замен, делеций и/или вставок по сравнению с конкретными аминокислотными последовательностями, приведенными на фиг.18. Варианты с "делецией" могут содержать делецию отдельных аминокислот, делецию небольших групп аминокислот, таких как 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или делецию более крупных аминокислотных областей, такую как делеция конкретных доменов аминокислот или других элементов. Варианты с "заменой", как правило, вовлекают замену одной или нескольких аминокислот тем же количеством аминокислот и внесение консервативных аминокислотных замен. Например, аминокислота может быть замещена альтернативной аминокислотой, имеющей сходные свойства, например, другой основной аминокислотой, другой кислотной аминокислотой, другой нейтральной аминокислотой, другой заряженной аминокислотой, другой гидрофильной аминокислотой, другой гидрофобной аминокислотой, другой полярной аминокислотой, другой ароматической аминокислотой или другой алифатической аминокислотой. Некоторые свойства 20 основных аминокислот, которые можно использовать для выбора подходящих заместителей, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Ala	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Met	гидрофобная, нейтральная
Cys	полярная, гидрофобная, нейтральная	Asn	полярная, гидрофильная, нейтральная

Asp	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Pro	гидрофобная, нейтральная
Glu	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Gln	полярная, гидрофильная, нейтральная
Phe	ароматическая, гидрофобная, нейтральная	Arg	полярная, гидрофильная, заряженная (+)
Gly	алифатическая, нейтральная	Ser	полярная, гидрофильная, нейтральная
His	ароматическая, полярная, гидрофильная, заряженная (+)	Thr	полярная, гидрофильная, нейтральная
Ile	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Val	алифатическая, гидрофобная, нейтральная
Lys	полярная, гидрофильная, заряженная (+)	Trp	ароматическая, гидрофобная, нейтральная
Leu	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Tyr	ароматическая, полярная, гидрофобная

Вариант интерферона-лямбда может иметь аминокислотную последовательность, которая обладает более чем приблизительно 60% или более чем приблизительно 70%, например 75 или 80%, как правило, более чем приблизительно 85%, например, более чем приблизительно 90 или 95% идентичностью аминокислот с аминокислотными последовательностями, представленными на фиг.18. Варианты могут сохранять по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с последовательностями, представленными на фиг.18. Варианты, как правило, сохраняют приблизительно 60% – приблизительно 99%

идентичность, приблизительно 80% – приблизительно 99%
 идентичность, приблизительно 90% – приблизительно 99%
 идентичность или приблизительно 95% – приблизительно 99%
 идентичность. Этот уровень идентичности аминокислот может наблюдаться по всей длине соответствующей последовательности SEQ ID NO или на протяжении части последовательности, например, на протяжении 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 или более аминокислот.

Термин "идентичность", как используют в рамках изобретения, указывает на то, что в любом конкретном положении выровненных последовательностей аминокислотные остатки являются идентичными между последовательностями. Термин "сходство", как используют в рамках изобретения, указывает на то, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотные остатки являются сходными между последовательностями. Например, лейцин может быть замещен изолейцином или валином. Другие аминокислоты, которые часто могут быть замещены другими, включают, но не ограничиваются ими:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи)
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи); и
- цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие содержащие серу боковые цепи).

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой производное of IFN- λ 1.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой производное of IFN- λ 2.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой производное of IFN- λ 3.

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой производное of IFN- λ 4.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда может представлять собой или может содержать производное одной из

конкретных последовательностей, представленных на фиг.18. В одном примере производное может включать структурный аналог встречающейся в природе аминокислоты. Альтернативно аминокислота может быть модифицированной, например, меченой.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда по изобретению является пегилированным т.е. интерферон-лямбда ковалентно связан с поли(этиленгликолем) (ПЭГ). Способы получения пегилированных белков хорошо известны в данной области, см. например Chapman A et al., 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 531-545.

В одном варианте осуществления пегилированный интерферон-лямбда представляет собой ПЭГ-интерферон лямбда-1а "лямбда" (Andersen et al., 2013). "Лямбда" представляет собой исследовательское терапевтическое средство на основе интерферона типа III, первоначально разработанное в ZymoGenetics (теперь полностью дочернее предприятие Bristol-Myers Squibb). Лицензия на него была выдана Eiger Biopharmaceuticals в 2016 году и в настоящее время он проходит клиническую разработку для лечения инфекции вирусом хронического гепатита дельта (HDV).

В одном варианте осуществления функциональный миметик интерферона-лямбда представляет собой антитело.

Молекулы антител по настоящему изобретению могут включать полную молекулу антитела, имеющую полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или его фрагмент или антигенсвязывающую часть. Термин "антигенсвязывающая часть" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность селективно связываться с антигеном. Было показано, что функцию связывания антигена у антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Антитела и их фрагменты и антигенсвязывающие части могут представлять собой, но не ограничиваться ими Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', $F(ab')_2$, Fv, однодоменные антитела (например, VH, или VL, или VHH), scFv, двух-, трех- или четырехвалентные антитела, бис-scFv, диантитела, триантитела, тетраантитела и связывающие эпитоп фрагменты любого из

вышеуказанных (см., например Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Способы получения и производства этих фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Другие фрагменты антител для применения в рамках настоящего изобретения включают Fab- и Fab'-фрагменты, описанные в международных заявках на патент WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171, и фрагменты Fab-dAb, описанные в международной заявке на патент WO2009/040562. Поливалентные антитела могут обладать множеством специфичностей или могут быть моноспецифическими (см., например, WO 92/22853 и WO 05/113605). Эти фрагменты антител можно получать с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и фрагменты можно подвергать скринингу в отношении пригодности аналогично тому, как интактные антитела.

Антитело по изобретению представляет собой функциональный миметик интерферона-лямбда и индуцирует те же или сходные биологические эффекты, что и белок дикого типа. Например, антитело может связываться с эпитопом на рецепторе интерферона-лямбда, активирующим передачу сигнала рецептора и запускаящем транскрипцию IFN-стимулируемых генов.

В одном варианте осуществления производное интерферона-лямбда представляет собой низкомолекулярную химическую структуру (такую как химическая структура с молекулярной массой менее 900 дальтон).

Способы скрининга химических библиотек для идентификации низкомолекулярных химических структур, которые могут быть потенциальными кандидатами на роль лекарственных средств, известны в данной области. Например, химическую библиотеку можно тестировать в анализе связывания лиганд-рецептор или в модели на клеточной культуре фиброза органа, как описано в примере 2.

Фибротические заболевания

Примеры фибротических заболеваний, которые можно лечить с использованием интерферона-лямбда по изобретению, включают, но

не ограничиваются ими, интерстициальное заболевание легких, фиброз легких, такой как идиопатический фиброз легких, силикоз, обусловленный гиперчувствительностью пневмонит, неспецифическую интерстициальную пневмонию, ревматоидное легкое, склеродермию, хроническое обструктивное заболевание легких и кистозный фиброз; фиброз почек (включая хронический гломерулонефрит, тубулоинтерстициальные нефропатии и генетические заболевания почки), такие как диабетическая нефропатия, гипертензивный нефросклероз, фокальный сегментный гломерулосклероз, IgA-нефропатия, мезангиальный пролиферативный гломерулонефрит, мембранозная нефропатия, вазоренальное заболевание, поликистоз почек, хроническая нефропатия трансплантата и болезнь Гудпасчера; фиброз легких и цирроз печени, включая первичный склерозирующий холангит, первичный билиарный цирроз, индуцируемые алкоголем заболевания печени и неалкогольный стеатогепатит (включая другие заболевания печени, связанные с жирными кислотами); а также фиброз эндомиокарда, медиастинальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, инкапсулирующий перитонеальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, нефрогенный системный фиброз, болезнь Крона (плюс другие заболевания, вызывающие стриктуру кишечника), келоид, инфаркт миокарда, склеродермию, системную склеродермию и артрофиброз.

В одном варианте осуществления фиброз представляет собой фиброз почек (и в этом случае IFN- λ может представлять собой IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$, IFN- $\lambda 3$ или IFN- $\lambda 4$).

В одном варианте осуществления фиброз представляет собой фиброз легких (и в этом случае IFN- λ может представлять собой IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$, IFN- $\lambda 3$ или IFN- $\lambda 4$).

В одном варианте осуществления фиброз представляет собой фиброз тонкого кишечника (и в этом случае IFN- λ может представлять собой IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$, IFN- $\lambda 3$ или IFN- $\lambda 4$).

В одном варианте осуществления фиброз представляет собой фиброз кожи (и в этом случае IFN- λ может представлять собой IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$, IFN- $\lambda 3$ или IFN- $\lambda 4$).

В одном варианте осуществления фиброз представляет собой

фиброз печени (и в этом случае IFN- λ может представлять собой IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$, IFN- $\lambda 3$ или IFN- $\lambda 4$).

В одном варианте осуществления фиброз представляет собой перитонеальный фиброз (и в этом случае IFN- λ может представлять собой IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$, IFN- $\lambda 3$ или IFN- $\lambda 4$).

В одном варианте осуществления фиброз представляет собой фиброз поджелудочной железы (и в этом случае IFN- λ может представлять собой IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$, IFN- $\lambda 3$ или IFN- $\lambda 4$).

В одном варианте осуществления фиброз представляет собой атеросклероз (и в этом случае IFN- λ может представлять собой IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$, IFN- $\lambda 3$ или IFN- $\lambda 4$).

В одном варианте осуществления фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза почек, фиброза легких, фиброза тонкого кишечника, фиброза кожи, фиброза печени, перитонеального фиброза, фиброза поджелудочной железы и атеросклероза.

В одном варианте осуществления фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза почек, фиброза легких, фиброза тонкого кишечника, фиброза кожи, перитонеального фиброза, фиброза поджелудочной железы и атеросклероза.

В одном варианте осуществления фиброз не ассоциирован с микробной инфекцией, например, вирусной инфекцией. Таким образом, индивидуум, которого лечат в рамках изобретения, может представлять собой индивидуума, который не имеет инфекции, такой как вирусная инфекция. Например, индивидуум может представлять собой индивидуума, который не имеет вирусной инфекции, о которой известно, что она поддается лечению IFN- λ . Индивидуум может представлять собой индивидуума, который не инфицирован вирусом гепатита, таким как вирус гепатита А, В или С; вирус гриппа; вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS); коронавирус; вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); вирус простого герпеса 2 типа (HSV2); цитомегаловирус (CMV); вирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS); норовирус; ротавирус или вирус Эбола.

Фармацевтические композиции, дозировки и режимы дозирования

Интерферон-лямбда по изобретению или его функционально активный фрагмент или производное, может быть предоставлен в фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция обычно является стерильной и, кроме того, может содержать фармацевтически приемлемый адъювант и/или носитель.

Как используют в рамках изобретения, "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, обеспечивающие изотоничность и замедляющие всасывание средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Носитель может быть пригодным для парентерального, например, внутривенного, внутримышечного, внутрикожного, внутриглазного, внутрибрюшинного, подкожного, внутривerteбального или других парентеральных путей введения, например, посредством инъекции или инфузии. Альтернативно носитель может быть пригодным для непарентерального введения, такое как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения. Носитель может быть пригодным для перорального введения. В зависимости от пути введения, интерферон-лямбда или его функционально активный фрагмент или производное могут быть покрыты материалом, защищающим их от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать их.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не сообщает никаких нежелательных токсикологических эффектов. Примеры таких солей включают кислотнo-аддитивные соли и основнo-аддитивные соли.

Фармацевтически приемлемые носители включают водные носители или разбавители. Примеры подходящих водных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, забуференную воду и солевой раствор. Примеры других носителей включают этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло,

и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Во многих случаях является желательным включение в композицию обеспечивающих изотоничность веществ, например, сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорид натрия.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена в качестве раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать дополнительные активные ингредиенты.

Также в объем настоящего изобретения входят наборы, содержащие интерферон-лямбда по изобретению и инструкции по применению. Кроме того, набор может содержать один или несколько дополнительных реагентов, таких как дополнительное терапевтическое или профилактическое средство, как описано выше.

Интерферон-лямбда по изобретению, или его составы или композиции, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения фибротического заболевания.

В одном варианте осуществления лечение фибротического заболевания представляет собой терапевтическое лечение. При терапевтических применениях соединения вводят индивидууму, уже страдающему от нарушения или состояния, как описано выше, в количестве, достаточном для излечения, смягчения или частичной остановки состояния или одного или нескольких его симптомов. Такое терапевтическое лечение может приводить к уменьшению тяжести симптомов заболевания или к увеличению частоты или длительности бессимптомных периодов. Количество, достаточное для этого, определяют как "терапевтически эффективное количество".

В одном варианте осуществления лечение фибротического заболевания представляет собой профилактическое лечение. При профилактических применениях составы вводят индивидууму, имеющему риск нарушения или состояния, как описано выше, в количестве, достаточном для предупреждения или уменьшения последующих эффектов состояния или одного или нескольких его

симптомов. Количество, достаточное для этого, определяют как "профилактически эффективное количество".

Эффективные количества для каждой цели зависят от тяжести заболевания или повреждения, а также от массы тела и общего состояния индивидуума.

Индивидуум, которому проводят введение, может представлять собой человека или не являющееся человеком животное. Термин "не являющееся человеком животное" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, земноводные, пресмыкающиеся и т.д. Типичным является введение человеку.

Антитело/модулятор или фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения варьируются в зависимости от требуемых результатов. Примеры путей введения для фармацевтических композиций по изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутриглазной, внутрибрюшинный, подкожный, внутрипозвоночный или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. Выражение "парентеральное введение", как используют в рамках изобретения, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции. Альтернативно фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить не парентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения. Фармацевтическая композиция по изобретению может быть предназначена для перорального введения.

Подходящая дозировка фармацевтической композиции по изобретению может быть определена квалифицированным медицинским специалистом. Фактические уровни дозировок активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения требуемого

терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и пути введения, без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозирования будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу тела, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующий медицинский анамнез подвергнутого лечению пациента, и сходные факторы, хорошо известные в области медицины.

Подходящая доза может находиться в диапазоне, например, от приблизительно 0,01 мкг/кг до приблизительно 1000 мг/кг массы тела, как правило, от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела подвергнутого лечению пациента. Например, подходящая дозировка может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг массы тела в сутки или от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг массы тела в сутки.

Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократную дозу, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в зависимости от потребностей терапевтической ситуации. Как используют в рамках изобретения, единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных дозировок для подвергнутого лечению индивидуумов; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, вычисленное для обеспечения требуемого терапевтического эффекта, совместно с требуемым фармацевтическим носителем.

Введение может осуществляться в одной или нескольких дозах. Множество доз можно вводить посредством одного и того же или различных путей и в одно и то же или в различные места. Альтернативно дозы могут иметь форму состава с замедленным

высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота могут варьироваться в зависимости от времени полужизни антагониста у пациента и желаемой длительности лечения.

Как упоминалось выше, модуляторы/антитела или фармацевтические композиции по изобретению можно вводить совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами.

Комбинированного введения двух или более средств можно достигать рядом различных способов. Оба из них можно вводить вместе в одной композиции, или их можно вводить в отдельных композициях в качестве части комбинированной терапии. Например, одно из них можно вводить до, после или одновременно с другим.

В одном варианте осуществления интерферон-лямбда по изобретению вводят в комбинации с другим терапевтически активным соединением. В одном варианте осуществления другое терапевтически активное соединение представляет собой другое противофиброзное терапевтическое средство.

Альтернативно интерферон-лямбда можно вводить не в комбинации с другим терапевтически активным соединением. Например, пациент, которого лечат интерфероном-лямбда, может представлять собой пациента, которого не лечат противовирусным средством, таким как другой интерферон (например, интерферон типа I или интерферон типа II, такой как интерферон-гамма).

ЧЕРТЕЖИ

фиг.1: Идентификация IL-28A в качестве противофиброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином

В условиях скрининга IL-28A (ILFNL2) мыши вводили мышам посредством гидродинамической трансфекции в качестве пары кДНК (т.е. кДНК IL-28A с другой неописанной кДНК) (размер группы n=15 для всех групп лечения) до введения адриамицина посредством в/в инъекции для инъекции хронического заболевания почек. Контрольных мышей трансфицировали только солевым раствором перед инъекцией адриамицина. Проводили мониторинг мышей в течение вплоть до 49 суток и после умерщвления определяли уровни гидроксипролина в почках (фиг.1(a) и (b)) и уровни креатинина в

сыворотке (фиг.1 (с)) (отсутствуют кондициональные данные выживаемости для первичного скрининга).

Фиг. для гидроксипролина (мкг/мг почки) и сывороточного креатинина (мкг/мл) представляют собой диаграммы размаха. Центральная горизонтальная линия показывает медиану данных, и ящик располагается с 25-го по 75-й процентиля. "Усы" охватывают типичный диапазон данных. Нормализованный гидроксипролин (коллаген почек) демонстрирует среднее значение с планкой погрешностей +SEM, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

фиг.2: Подтверждение IL-28A в качестве противофиброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином

IL-28A (IFNL2) мыши вводили мышам посредством гидродинамической трансфекции в качестве единичной кДНК (размер группы $n=22$ для всех групп лечения) до введения адриамицина посредством в/в инъекции для индукции хронического заболевания почек. Контрольных мышей трансфицировали только солевым раствором перед инъекцией адриамицина. Мышей наблюдали в течение 49 суток. После умерщвления определяли уровни гидроксипролина в почках (фиг.2 (а) и (б)) и сывороточные уровни креатинина (фиг.2 (с)), и регистрировали кондициональные данные выживаемости на протяжении периода исследования (фиг.2 (д)).

Фиг. для гидроксипролина (мкг/мг почки) и сывороточного креатинина (мкг/мл) представляют собой диаграммы размаха. Центральная горизонтальная линия показывает медиану данных и ящик располагается с 25-го по 75-й процентиля. "Усы" охватывают типичный диапазон данных. Нормализованный гидроксипролин (коллаген почек) демонстрирует среднее значение с планкой погрешностей +SEM, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

фиг.3: Идентификация IL-28B в качестве противофиброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином

При первичном скрининге IL-28B (ILFNL3) мыши вводили мышам посредством гидродинамической трансфекции в качестве пары кДНК (размер группы $n=15$ для всех групп лечения) до введения адриамицина, и проводили мониторинг мышей в течение вплоть до 49 суток и после умерщвления определяли уровни гидроксипролина в почках (фиг.3 (а) и (б)) и уровни креатинина в сыворотке

(фиг.3(с)) (отсутствуют кондициональные данные выживаемости для первичного скрининга). Контрольных мышей трансфицировали только солевым раствором перед инъекцией адриамицина.

Фиг. для гидроксипролина (мкг/мг почки) и сывороточного креатинина (мкг/мл) представляют собой диаграммы размаха. Центральная горизонтальная линия показывает медиану данных и ящик располагается с 25-го по 75-й процентиля. "Усы" охватывают типичный диапазон данных. Нормализованный гидроксипролин (коллаген почек) демонстрирует среднее значение с планкой погрешностей +SEM, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Фиг.4: Подтверждение IL-28B в качестве противofiброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином

IL-28B (IFNL3) мыши вводили группе мышей посредством гидродинамической трансфекции в качестве единичного клона (размер группы $n=22$ для всех групп лечения) до введения адриамицина, и наблюдали за мышами в течение 49 суток. Контрольных мышей трансфицировали только солевым раствором перед инъекцией адриамицина. Мышей наблюдали в течение 49 суток. После умерщвления определяли уровни гидроксипролина в почках (фиг.4(а) и (б)) и сывороточные уровни креатинина (фиг.4(с)) и регистрировали кондициональные данные выживаемости на протяжении периода исследования (фиг.4(д)).

Фиг. для гидроксипролина (мкг/мг почки) и сывороточного креатинина (мкг/мл) представляют собой диаграммы размаха. Центральная горизонтальная линия показывает медиану данных и ящик располагается с 25-го по 75-й процентиля. "Усы" охватывают типичный диапазон данных. Нормализованный гидроксипролин (коллаген почек) демонстрирует среднее значение с планкой погрешностей +SEM, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Фиг.5: Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве противofiброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

После умерщвления почки из исследования, описанного на фиг.2 и фиг.4, фиксировали в NBF, заливали парафином, нарезали на срезы и окрашивали либо гематоксилином и эозином (H&E), либо пикросириусом красным (PSR), либо трихромом по Массону (MT).

Затем предметные стекла визуализировали с использованием сканера предметных стекол Hamamatsu. Репрезентативные изображения окрашенных PSR почек представлены для IL-28B на фиг.5(a) для 1 наивной мыши, 3 мышей, которым вводили адриамицин и солевой раствор, и 3 мышей, которым вводили адриамицин и также вводили IL-28B, и для IL-28A на фиг.5(f) для 1 наивной мыши, 3 мышей, которым вводили адриамицин и солевой раствор, и 3 мышей, которым вводили адриамицин и также вводили IL-28A. Все срезы почек мышей после умерщвления для обеих групп IL-28B (10 наивных мышей, 18 мышей, которым вводили солевой раствор, и 22 мышей, которым вводили IL-28B) и IL-28A (8 наивных мышей, 20 мышей, которым вводили солевой раствор, и 19 мышей, которым вводили IL-28A) визуализировали, и всю площадь, покрытую красителем PSR, оценивали с использованием платформы для анализа изображений Definiens, как представлено на фиг.5(b) и фиг.5(g), соответственно. Кроме того, все предметные стекла вручную оценивались в отношении фиброза отдельными экспертами в области фиброза (2 ученых и 1 клинический патолог) и показатели патологии вычисляли для IL-28B после окрашивания H&E (фиг.5(c)) и окрашивания PSR (фиг.5(d) и (e)) и для IL-28A после окрашивания PSR (фиг.(h)) и окрашивания MT (фиг.(i)). Увеличение= $\times 100$.

фиг.6: Эффект IL-28A в модели фиброза печени *in vitro* на ЕСМ

Первичные звездчатые клетки печени (фиг.6(a)) (посеянные в количестве 1000 клеток/лунка) или первичные звездчатые клетки человека в сокультуре с первичными гепатоцитами человека (фиг.6(b)) (посеянные в количестве 1000 клеток/лунка, соотношение 1:1) обрабатывали IL-28A в культуре в течение 5 суток. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли путем иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве среднего значения $\pm$ SD для 4 отдельных лунок.

фиг.7: Эффект IL-28A и IL-28B в модели фиброза печени *in vitro* на ЕСМ плюс TGF β

Первичные звездчатые клетки печени (в количестве 1000 клеток/лунка) (фиг.7(a)) или первичные звездчатые клетки человека в сокультуре с первичными гепатоцитами человека (в количестве 1000 клеток/лунка, соотношение 1:1) (фиг.7(b)) обрабатывали IL-28A или IL-28B в культуре в течение 5 суток в присутствии TGF β в количестве 250 пг/мл. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли путем иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве среднего значения +/- SD для 4 отдельных лунок.

фиг.8: Многопараметрические изображения, демонстрирующие эффект IL-28A и IL-28B в ЕСМ стимулированной TGF β 1 сокультуры звездчатых клеток и гепатоцитов

Первичные звездчатые клетки в сокультуре с первичными гепатоцитами (в соотношении 1:1 с конечной концентрацией клеток 1000 клеток/лунка), стимулированные TGF β 1 (250 пг/мл) культивировали отдельно (сокультура TGF β 1) или обрабатывали IL-28A или IL-28B в количестве 10000, 1000, 100 или 10 нг/мл в течение 5 суток. Представленные изображения соответствуют 1 репрезентативному полю из 16 полей для каждого условия. Увеличение проводили с помощью объектива $\times 10$.

фиг.9: Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в модели *in vitro* на ЕСМ TGF β 1-стимулированных фибробластов тонкого кишечника

Первичные фибробласты тонкого кишечника человека (в количестве 2000 клеток/лунка) обрабатывали IL-28A, IL-28B или IL-29 (все в количестве 10 нг/мл) в культуре в течение 7 суток в присутствии TGF β (10 нг/мл). Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли посредством иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве среднего значения +/- SD для 4

отдельных лунок.

Фиг.10: % Ингибирование IL-28A и IL-28B в модели *in vitro* на ЕСМ сокультуры кератиноцитов кожи и фибробластов

Первичные фибробласты дермы человека из 3 индивидуальных партий помещали в сокультуру с первичными кератиноцитами человека (в соотношении 9:1 с конечной концентрацией клеток 1500 клеток/лунка) и обрабатывали возрастающими количествами IL-28A или IL-28B в течение 7 суток. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли посредством иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Нормализованные данные для 3 партий вычисляли в качестве % ингибирования и наносили на график в качестве среднего значения $\pm$ SD. Жизнеспособность клеток определяли с использованием PrestoBlue, для 3 партий фибробластов в сокультуре с кератиноцитами, с нормализацией к контрольной сокультуре и усреднением данных с получением кратности изменения.

Фиг.11: Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в модели *in vitro* на ЕСМ сокультуры кератиноцитов кожи и фибробластов

Первичные фибробласты дермы человека в сокультуре с первичными кератиноцитами человека (в соотношении 9:1 с конечной концентрацией клеток 1500 клеток/лунка) обрабатывали IL-29, IL-28A или IL-28B в течение 7 суток в диапазоне концентраций 1250-10000 нг/мл цитокина. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли посредством иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве среднего значения $\pm$ SD для 4 отдельных лунок. Жизнеспособность клеток определяли с использованием PrestoBlue.

Фиг.12: Многопараметрические изображения, демонстрирующие эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в модели *in vitro* на ЕСМ сокультуры кератиноцитов кожи и фибробластов

Первичные клетки дермы человека от репрезентативного донора в сокультуре с первичными кератиноцитами (в соотношении 9:1 с

конечной концентрацией клеток 1500 клеток/лунка) культивировали отдельно (контроль) или обрабатывали IL-29, IL-28A или IL-28B в количестве 10000 или 1250 /мл в течение 7 суток. Изображения соответствуют 1 объединенному сигналу для белков матрикса ЕСМ фибронектина, Col I и III и Col IV, и для них представлено 1 репрезентативное поле из всего 16 полей на каждые условия. Увеличение проводили с помощью объектива $\times 10$.

фиг.13: Эффект IL-28A и IL-28B в модели *in vitro* на ЕСМ стимулированных IL-1 α фибробластов кожи

Первичные фибробласты дермы человека (1500 клеток/лунка), стимулированные IL-1 α (10 нг/мл), обрабатывали возрастающими количествами IL-28A или IL-28B в культуре в течение 7 суток. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли посредством иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве среднего значения $\pm$ SD для 4 отдельных лунок.

Жизнеспособность клеток определяли с использованием PrestoBlue. Данные являются репрезентативными для одной из двух различных партий фибробластов.

фиг.14: Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в модели *in vitro* на ЕСМ сокультуры RPTEC почки-фибробласты

Первичные эпителиальные клетки проксимальных канальцев (RPTEC) человека помещали в сокультуру с первичными фибробластами почки человека (в соотношении 1:1 с конечной концентрацией посева 2000 клеток/лунка) и обрабатывали IL-29, IL-28A или IL-28B в течение 7 суток. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли посредством иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве среднего значения $\pm$ SD для 4 отдельных лунок. Жизнеспособность клеток определяли с использованием PrestoBlue. IL-29, IL-28A или IL-28B либо

добавляли к сокультуре RPTEC и фибробластов на 0 сутки (фиг.14(a)), либо добавляли к RPTEC за 24 часа до комбинирования с фибробластами (фиг.14(b)), либо добавляли к фибробластам за 24 часа до комбинирования с RPTEC (фиг.14(c)).

фиг.15: Сравнение форматов добавления в отношении эффекта IL-28A, IL-28B и IL-29 в модели *in vitro* на ЕСМ сокультуры RPTEC почек и фибробластов

Данные, представленные на фиг.14, вновь наносили на график, демонстрирующий эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в системе сокультуры клеток почки с использованием 3 различных протоколов добавления на одном графике, где IL-28A, IL-28B или IL-29 добавляли к сокультуре RPTEC и HRF вместе (обозначается как сокультура), сначала RPTEC и через 24 часа добавляли HRF (обозначается как добавление сначала RPTEC), и сначала HRF и через 24 часа добавляли RPTEC (обозначается как добавление сначала HRF) и сокультивирование продолжали в течение 7 суток с повторным нанесением данных для фибронектина и коллагенов I и III на график на фиг.15 (a) и (b), соответственно. Маркеры ЕСМ анализировали для каждого цитокина с использованием дисперсионного анализа, учитывающего различия между порядком добавления (сокультура, сначала RPTEC и сначала HRF) и дозы (от 0 до 10000 нг/мл). Проводились сравнения после анализа и для коррекции указанных значений p использовали поправку Бонферрони. Все анализы проводили с использованием SAS v9.4 (SAS Institute). Дозы цитокина, достигающие значимости, обозначены на графиках как **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ и * $p < 0,05$.

фиг.16: Многопараметрические изображения, демонстрирующие эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ сокультуры RPTEC почек и фибробластов

Первичные эпителиальные клетки проксимальных канальцев (RPTEC) человека в сокультуре с первичными фибробластами почки человека (в соотношении 1:1 с конечной концентрацией клеток 2000 клеток/лунка при посеве) культивировали отдельно (контроль) или обрабатывали IL-29, IL-28A или IL-28B в количестве 1000, 100 или 10 нг/мл в течение 7 суток. Цитокины добавляли к RPTEC за 24 часа до включения фибробластов в культуру, как представлено на

фиг.14(b). Представлены изображения для 1 репрезентативного поля из 16 полей для каждой условий. Увеличение проводили с помощью объектива $\times 10$.

Фиг.17: Эффект IL-28A и IL-28B в модели *in vitro* на ЕСМ сокультуры SAEpithelial легкого и фибробластов

Первичные эпителиальные клетки мелких дыхательных путей (SAEpithelial) человека в сокультуре с первичными фибробластами легкого IPF (соотношение 1:1 при конечной концентрации клеток 2000 клеток/лунка при посеве) обрабатывали IL-28A или IL-28B в течение 7 суток. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли посредством иммунофлуоресцентного мечения, в то время как общие белки ЕСМ идентифицировали посредством окрашивания Flamingo pink. Визуализацию и количественное определение проводили на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве среднего значения $\pm$ SD для 4 отдельных лунок. Жизнеспособность клеток определяли с использованием со считыванием данных по флуоресценции.

Фиг.18: Последовательности белков и ДНК для IFNL1, IFNL2, IFNL3 и IFNL4

Последовательности белков IFNL1, IFNL2, IFNL3 и IFNL4 были получены из базы данных Uniprot и последовательности ДНК IFNL1, IFNL2, IFNL3 и IFNL4 были из GenBank.

Фиг.19: Эффект IL-28A и IL-29 в модели фиброза печени *in vitro* на сокультуре звездчатых клеток печени человека и эпителиальных клеток

Первичные звездчатые клетки человека и первичные внутрипеченочные билиарные эпителиальные клетки помещали в сокультуру в количестве 1000 клеток/лунка (соотношение 1:1) и обрабатывали посредством IL-28A или IL-29 в течение 5 суток. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли посредством иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве

среднего значения $\pm$ SD для 4 отдельных лунок.

Фиг.20: Эффект IL-28A на выживаемость подоцитов в гломерулярной сфероидной 3D-модели гломерулосклероза *in vitro*

(a) 3D-гломерулярные сфериды конструировали из внутренней части из гломерулярных эндотелиальных клеток человека, окруженной GFP-мечеными подоцитами человека. (b) Сфериды либо выращивали в среде, либо обрабатывали плазмой пациента с очаговым сегментальным гломерулярным склерозом (FSGS) в 15% конечной концентрации плюс или минус белок IL-28A человека. В каждом эксперименте и для каждого условия визуализировали по меньшей мере 5 сфероидов. (c) Затем 2D-проекции максимальной интенсивности (MIP) анализировали с использованием анализа изображений Definiens для определения маркерных площади выше пороговой интенсивности в зеленом канале в различных условиях культивирования, которая нанесена на график в качестве площади маркера в виде доли от общей площади сфероида. 7% подоцитов были мечеными посредством GFP.

Фиг.21: Гидродинамическая трансфекция IL-28B мыши защищает от фиброза в модели фиброза почек с односторонней обструкцией мочеточника (UUO) у мышей

Мышей либо оперировали с целью UUO (контроль с операцией UUO HDT, n=10), либо не оперировали (non-op, n=5), либо оперировали UUO, но подвергали лечению IL-28B на сутки -1 для профилактического дозирования (IL-28B HDT сутки -1, n=10), либо подвергали лечению IL-28B на 7 суток для терапевтического дозирования (IL-28B HDT сутки 7, n=10) и всех животных умерщвляли на 21 сутки, почки извлекали, фиксировали в NBF, заливали парфином, нарезали на срезы и окрашивали пикросириусом красным (PSR). Затем предметные стекла визуализировали с использованием сканера предметных стекол Hamamatsu. Репрезентативные изображения окрашенных PSR срезов почек представлены на фиг.21(a) для 1 нормальной мыши, 2 прооперированных UUO контрольных мышей, 2 прооперированных UUO и подвергнутых лечению IL-28B на сутки -1 мышей или 2 прооперированных UUO и подвергнутых лечению IL-28B на 7 суток мышей посредством гидродинамической трансфекции. Все срезы почек

мышей после умерщвления (5× неоперированных, 10× контроль UUO, 10× UUO IL-28B на сутки -1 и 10× мышей, которым вводили UUO IL-28B на 7 суток) визуализировали и всю площадь, покрытую красителем PSR, оценивали с использованием платформы для анализа изображений Definiens, считывающей общую окрашенную площадь (фиг.21(b)) или площадь высокоинтенсивного окрашивания (фиг.21(c)). % площадь коллагена представлена в качестве среднего значения $\pm$ SEM для групп лечения по сравнению с контролем SEAP с использованием критерия множественных сравнений Даннетта; **= $p<0,01$, *** $p<0,001$ и ****= $p<0,0001$.

SEAP=контрольный белок секретируемая щелочная фосфатаза.

фиг.22: Эффект IL-29 в модели фиброза почек на монокультуре эпителиальных клеток проксимальных канальцев почек человека

Эпителиальные клетки проксимальных канальцев человека помещали в сокультуру в количестве 2000 клеток/луночка и обрабатывали IL-29 в течение 5 суток. Клетки удаляли и белки ЕСМ, фибронектин, коллаген I и III и коллаген IV количественно определяли посредством иммунофлуоресцентного мечения с визуализацией и количественным определением на Cellomics Arrayscan. Данные соответствуют средней общей интенсивности, нанесенной на график в качестве среднего значения $\pm$ SD для 4 отдельных лунок.

фиг.23: Лечение посредством IL-29 человека посредством гидродинамической трансфекции защищает от тубулоинтерстициального фиброза в модели фиброза почек с односторонней обструкцией мочеточника на мышах

Мышей C57Bl/6 подвергали гидродинамической трансфекции контрольным вектором, содержащим SEAP (n=10), или вектором, содержащим конструкцию IL-29 человека (n=9). Через 24 часа после трансфекции мышей подвергали односторонней обструкции мочеточника (UUO) левой почки, или мышей не оперировали (n=4). Через 7 суток гидродинамическую трансфекцию повторяли и животных умерщвляли через 19 суток после UUO. Фиг.23(a); образцы сыворотки получали от мышей на 0 сутки (24 часа после трансфекции) и вновь на 19 сутки и анализировали в отношении

белка IL-29 человека. Уровни IL-29 человека наносили на график, сравнивающий уровни IL-29 в группе UUO IL-29 на 0 сутки, группе D19 UUO SEAP при умерщвлении и группе UUO IL-29 при умерщвлении.

Почки извлекали и фиксировали в NBF, заливали парафином, нарезали на срезы и окрашивали пикросириусом красным (PSR), а затем предметные стекла визуализировали с использованием сканера предметных стекол Hamamatsu. На фиг.23(b) представлены репрезентативные изображения нормальной почки, почки UUO, трансфицированной либо контрольным содержащим SEAP вектором, либо вектором, содержащим IL-29 человека, как показано при увеличении 100× (верхняя линия) и 200× (нижняя линия). Все срезы почек мышей при умерщвлении (4× неоперированных, 10× контрольных UUO SEAP, 9× UUO IL-29 на сутки -1) визуализировали и общую площадь, покрытую красителем PSR, оценивали с использованием платформы для анализа изображений Definiens, считывающей общую окрашенную площадь (фиг.23(c)). % площадь коллагена представлена в качестве среднего значения $\pm$ SEM, причем группу лечения IL-29 сравнивали с контрольной группой UUO+SEAP с использованием LSD критерия сравнений Фишера без внесения поправки; **= $p < 0,01$.

SEAP=контрольный белок секретируемая щелочная фосфатаза.

ССЫЛКИ

Adair J.R. and Lawson A.D.G., 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3): 209-217.

Andersen H., et al., 2013, Journal of Clinical and Translational Hepatology 1: 116-124.

Andreaskos et al 2017, Frontiers in Immunology, 8, article1232.

Bach et al., 1997, Ann Rev. Immunol. 15:563-591.

Bhushal et al 2017, Frontiers in Immunology, 8, article 671.

Biron et al., 2001, Immunity 14(6): 661-664

Blazek et al., 2015, J Exp Med 212(6): 845-853.

Blumer et al 2017, J. Biol. Chem. 292(43) 17928-17938.

Bochud et al., 2012, Hepatology 5(2):384-394

Broggi et al 2017, Nature Immunology, 18(10), 1084-1093

- Chow & Gale 2015, *Cell* 163(7), 1808-1808.e1
- Chapman A., et al., 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 531-545.
- Chiriac et al 2017, *Gastroenterology*, 153, 123-138
- Doyle et al., 2006, *Hepatology* 44(4): 896-906.
- Eslam and George, 2015, *Semin Liver Dis.* 35:402-420.
- Eslam et al., 2015, *Nature Communications* 6: 6422-6432.
- Gad et al., 2009, *Journal Biological Chemistry* 284(31): 20869-20875.
- Ge et al., 2009, *Nature* 461(7262):399-401.
- Gresser, 2015, *Biomed Pharmacother.* 71:29.
- Griffiths S. J. et al., 2013, *PLoS Pathog.* 9: e1003514.
- Guenterberg et al., 2010, *Molecular Cancer Therapeutics* 9(2):510-520.
- Guo et al., 2013, *PLoS One* 8(10): e77911.
- Hemann et al 2017, *Nature Immunology*, 18(10), 1061-1062
- Holliger P. and Hudson P.J., 2005, *Nature Biotech.* 23(9): 1126-1136.
- Hong et al., 2016, *Journal of Experimental Medicine* 10:1084-1098.
- Huang et al., 1993, *Science* 259(5102):1742-1745.
- Kanefuji et al. 2014, *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* (2014) 1, 14029.
- Kotenko, 2002, *Cytokine Growth Factor Rev* 13(3):223-240.
- Kotenko et al, 2003, *Nature Immunology* 4(1): 69-77
- Koltsida et al., 2011, *EMBO Molecular Medicine* 3(6): 348-361.
- Li et al., 2010, *European Journal of Cancer* 46(1):180-190.
- Liu et al., 1999, *Gene Therapy* 6, 1258-1266.
- Mahlakoiv T. et al., 2015, *PLoS Pathog.* 11: e1004782.
- McFarland et al., 2014, *Nature Immunology* 15: 72-79.
- Miknis et al., 2010, *Journal of Molecular Biology* 404:650-664.
- Mordstein M. et al., 2008, *PLoS Pathog.* 4: e1000151
- Numasaki et al., 2007, *Journal Immunology* 178(8): 5086-5098.

- Osterlund et al., 2007, Journal Immunology 179: 3434-3442.
- Park et al., 2012, Hepatology 56(6): 2060-2070.
- Pott J. et al., 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. 108: 7944-7949.
- Prokunina-Olsson et al., 2013, Nature Genetics 45(2): 164-171.
- Rallon et al., 2010, Aids 24(8):F23-29.
- Stahl et al., 1993, Cell 74: 587-590.
- Sato et al., 2006, Journal Immunology 176(12):7686-7694.
- Steen et al., 2010, Journal Interferon Cytokine Research 30(8): 597-602.
- Sheppard et al., 2003, Nature Immunology 4(1):63-68.
- Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2015, Proc. Natl. Acad. Sci. 112: E2376-E2384.
- Suppiah et al., 2009, Nature Genetics 41(10): 1100-1104.
- Tanaka et al., 2009, Nature Genetics 41 (10):1105-1109.
- Thomas et al., 2012, Gastroenterology 142 (4): 978-988.
- Verma R., et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216: 165-181.
- Wack et al 2015, Nature Immunology, 16(8), 802-809
- Wolk et al., 2013, Science Translational Medicine 5(204): 204ra129.
- Zhou et al., 2007, Journal of Virology, 81: 7749-7758.
- Zitzmann et al., 2006, Biochem. Biophys. Res. Commun. 344(4):1334-1341.
- WO1992/022853.
- WO2005/003169.
- WO2005/003170.
- WO2005/003171.
- WO2005/113605.
- WO2009/040562.

ПРИМЕРЫ

Сущность изобретения

Цитокины семейства интерферона- λ (IFN- λ), известные как IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) и IFN- λ 3 (IL-28B) передают сигнал

через особый рецептор комплекс, состоящий из цепей рецепторов IFN- λ R1 (IL-28R1) и интерлейкина-10R2 (IL-10R2).

С использованием скрининга *in vivo* с гидродинамической трансфекцией в модели индуцируемого адриамицином хронического заболевания почек (CKD) на мышах, IFN- λ 2 и IFN- λ 3 были определены как наилучшие средства. Наилучшее средство определялось, исходя из уровня фиброза почек, определяемого как 40% снижение уровней гидроксипролина в почках (коллаген почек). Как IFN- λ 2, так и IFN- λ 3, также продемонстрировали соответствующее сохранение функции почек, определяемое с помощью сывороточного креатинина. Это привело к увеличению кондициональных показателей выживаемости (т.е. не достижение конечной стадии почечной недостаточности) от 50% через 49 суток после трансфекции мышей, которым вводили адриамицин, солевым раствором, до 85% после трансфекции IFN- λ 2, и 100% для IFN- λ 3. Для подтверждения этого противофиброзного эффекта в альтернативной модели CKD с отличающимся стимулом, как IFN- λ 1, так и IFN- λ 3 вводили посредством гидродинамической трансфекции в модели хронического заболевания почек в виде индуцируемого односторонней обструкции мочеточника (UUO) фиброза почек, оба из которых защищали от тубулоинтерстициального фиброза.

Противофиброзный эффект лигандов IL-28R1 был подтвержден в нескольких моделях фиброза на первичных клетках человека *in vitro*, в которых определяется зрелый накопленный белок внеклеточного матрикса (ECM). Каждый из рекомбинантного IFN- λ 1, IFN- λ 2 и IFN- λ 3 человека ингибировал накопление ассоциированных с фиброзом белков ECM (фибронектин и коллагены I, III и IV) в моделях фиброза печени, легких, кишечника, кожи и почек *in vitro* на первичных клетках человека. Это наблюдается в нескольких моделях, включающих звездчатые клетки печени, сокультуры звездчатые клетки печени-гепатоциты (индуцируемые как базальным матриксом, так и TGF β), сокультуры звездчатые клетки печени-эпителиальные клетки, TGF β -индуцируемые фибробласты тонкого кишечника, IL-1 α -индуцируемые фибробласты дермы, сокультуры

кератиноциты-фибробласты дермы, сокультуры и монокультуры эпителиальных клеток проксимальных канальцев почек и фибробластов почек и сокультуры эпителиальных-IPF мелких дыхательных путей и фибробластов легких. В более комплексной модели гломерулярных органоидов для гломерулосклероза, применение плазмы от пациента с рецидивирующим нефротическим синдромом вызывало как снижению количество подоцитов, так и вытягивание отростков и ножек в соответствии с уплощением и потерей подоцитов, наблюдаемыми при многих гломерулярных заболеваниях, которые ведут к гломерулосклерозу и фиброзу почек. Применение рекомбинантного IFN- λ 2 в этой модели полностью препятствовало изменениям подоцитов, вызываемым плазмой этого пациента.

Было показано, что лиганды IL-28R1 обладают мощными противofiброзными эффектами в скрининге фиброза как *in vitro*, так и *in vivo*. Мощные эффекты описаны в моделях фиброза почек на мышцах *in vivo* и в многочисленных моделях фиброза у человека *in vitro* с соответствующими первичными клетками из систем органов печени, тонкого кишечника, кожи, почки и легких. Таким образом, эти белки обладают неожиданным потенциалом в качестве противofiброзных средств при множестве типов фиброза.

СПОСОБЫ

Мыши *in vivo*

Эффект IL-28A и IL-28B в модели хронического заболевания почек с индуцированным адриамицином фиброзом почек (CKD)

Самок мышей Balb/c в возрасте по меньшей мере 6 недель и массой более 24 г подвергали в/в инъекции через хвостовую вену кДНК (или пары кДНК для парных исследований) в соответствующем экспрессирующем векторе для гидродинамической трансфекции. Через 7 суток мышам вводили адриамицин (доксорубицин) в дозе 11 мг/кг в/б и подвергали мониторингу в течение 49 суток. Мониторинг мышей проводили каждые сутки в отношении массы тела и здоровья; мышей, которые теряли более 40% от исходной массы тела или демонстрировали физикальные признаки последней стадии почечной недостаточности, умерщвляли и получали данные. В конце периода

исследования из 49 суток всех мышей умерщвляли и почки и сыворотку собирали для анализа. Уровень гидроксипролина в почках определяли с использованием способа анализа QuickZyme (QuickZyme Biosciences) и уровень креатинина в сыворотке определяли с использованием способа с тремя ферментами и получали данные в виде сывороточного креатинина в мкг/мл. Фиброз почек (гидроксипролин) в группе солевого раствора плюс адриамицин, обозначаемой как "солевой раствор" на графиках, считался максимальным ответом заболевания. Он был принят за 100% и использовался для нормализации в группах лечения. Наивным животным не вводили адриамицин и каждый скрининговый эксперимент включал группу "HGF", в которой вводили адриамицин и кДНК для HGF. HGF использовали в качестве противофиброзного положительного контроля, и для контроля качества использовали снижение уровня гидроксипролина >40%.

Эффект IL-28 и IL-29 в модели фиброза на мышях с односторонней обструкцией мочеточника

Конструирование ДНК для гидродинамической трансфекции IL28В мышши и IL29 человека

Конструкцию ДНК для гидродинамической трансфекции создавали путем встраивания последовательности ДНК (NM_172140.1), кодирующей белок-предшественник IL29 человека (NP_742152.1) в вектор pLive (Mir5420, Mirus Bio LLC, 545 Science Dr., Madison, WI 53711 USA) с использованием рестрикционного расщепления NheI-XhoI с последующим лигированием гомологичных концов ДНК. Генную конструкцию (мРНК Ref Seq NM_177396), кодирующую IFNL3 мышши (NP_796370), клонировали в pLive (Mirus) с использованием стратегии рестрикционного расщепления посредством BamHI-XhoI как вектора, так и вставки, с последующим лигированием. Генные вставки в pLive проверяли посредством секвенирования ДНК. Гену предшествовала последовательность ССАСС непосредственно выше ATG, кодирующего начальный метионин сигнальной последовательности. Этот вектор содержит ген устойчивости к канамицину и ориджин pUC, который позволяет амплификацию ДНК в *Escherichia coli*. Более того, этот вектор содержит минимальный промотор альбумина мышши для транскрипции гена IFNL-1 человека,

фланкированного интронами с каждой стороны. [Вектор pLive позволяет длительную экспрессию белка в печени].

Конструкцию ДНК для гидродинамической трансфекции выделяли из культуры *Escherichia coli*, содержащей эту конструкцию, с использованием набора для выделения плазмиды, который ограничивает количество эндотоксина в растворе (HiSpeed Plasmid Giga EF, Qiagen). Плазмидную ДНК секвенировали по методу Сэнгера для подтверждения вставки.

В Kanefuji et al. и Liu et al. описаны типичные векторы для гидродинамической трансфекции.

Экспрессия белков посредством гидродинамической трансфекции (HDT)

Мышей подвергали гидродинамической трансфекции посредством 50 мкг вектора pLIVE-IL-29 человека, pLIVE-IL-28B мыши или pLIVE SEAP (Mirus Bio, каталожный номер # MIR 5320) в носителе TransIT-EE. Раствор, содержащий вектор, быстро инъецировали (в течение менее 2,5 секунд) внутривенно в объеме 2 мл. Перед гидродинамической инъекцией давали общую анестезию изофлураном и поддерживали в течение по меньшей мере 1 минуты после инъекции.

Количественное определение IL-28B мыши и IL-29 человека в сыворотке мыши

IL-28B мыши количественно определяли с использованием количественного анализа Meso scale discovery (MSD) с использованием коммерческих пар антител (RnD systems, каталожный номер # DY1598B) и сыворотку мыши разбавляли 1 к 100 для построения линейной стандартной кривой. IL-29 человека количественно определяли с использованием набора антител против IL-29 человека MSD U-plex (каталожный номер # B21WD) и сыворотку мыши разбавляли 1 к 100 для обеспечения линейного диапазона.

Модель хронического заболевания почек на основе фиброза почек, индуцированного односторонней обструкцией мочеточника (UUO)

Самцов мышей C57BL/6 (Charles River) массой по меньшей мере 19 г использовали для модели хронического заболевания почек на основе фиброза почек, индуцированного односторонней обструкцией мочеточника (UUO).

Хирургическую операцию проводили с использованием индуцированной изофлураном общей анестезии и в асептических условиях, подходящих для хирургических методик. Мышам проводили лапаротомию, а затем перевязывали левый мочеточник с использованием лигатуры 3.0 Mersilk. Мышечную стенку закрывали с использованием 5-0 Vicryl непрерывным образом, а кожу закрывали посредством подкожных швов с использованием 5-0 Vicryl. До хирургической операции и после хирургической операции проводили надлежащее обезболивание.

Взятие образцов крови проводили в соответствующие моменты времени, как подробно описано в результатах. Мышей удерживали с использованием общепринятого приспособления для фиксации мышей и 30 мкл крови отбирали из хвостовой вены способом прокола хвоста с использованием пипетки для точного отмеривания образца крови. Этот образец помещали в 0,2-мл пробирку для ПЦР (Thermo) и центрифугировали (20000g, 5 минут) для получения максимально возможного количества сыворотки, которую помещали в новую пробирку для ПЦР и хранили при -80°C .

На 19 или 21 сутки мышей подвергали анестезии с использованием изофлурана, кровь извлекали путем сердечной пункции в пробирки для сыворотки (Sarstedt) и мышей умерщвляли смещением шейных позвонков. Левую почку извлекали и две четверти быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Оставшуюся половину помещали в 10% нейтральный забуференный формалин, деградировали в гистопроцессоре и заливали парафином для гистологического анализа. Парафиновые блоки нарезали на срезы толщиной 4 мкм на микротоме и помещали на предметные стекла. Затем предметные стекла депарафинизировали и гидратировали, окрашивали пикросириусом красным (PSR), а затем промывали подкисленной водой. Затем предметные стекла дегидратировали, очищали и покрывали покровными стеклами. Предметные стекла оставляли сохнуть, а затем сканировали с использованием сканера предметных стекол Hamamatsu.

Предметные стекла целиком отправляли в Definiens Developer XD 64 и анализировали с использованием светопольного модуля. В

кратком изложении, области коры вручную помечали для удаления мозговой части из анализа. Пороговые уровни маркера (например, краситель PSR) определяли для индивидуальных маркеров на обучающем наборе данных не менее чем с четырех изображений. Затем алгоритм анализа запускали на специализированном сервере для определения площадей маркера выше пороговой интенсивности для каждого индивидуального маркера и площадь каждого маркера выше пороговой интенсивности определяли в качестве доли площади коры.

Гистологическая оценка уровня фиброза проводилась вслепую исследователями, являющимися специалистами в области фиброза печени, с использованием предпочитаемой ими комбинации срезов, окрашенных пикросириусом красным, трихромом по Массону, и гематоксилином и эозином. Использовали шкалу из 10 точек, где показатель 10 соответствовал очень тяжелому фиброзу, эквивалентному последней стадии почечной недостаточности, и 1 соответствовал норме. Параметрами, используемыми для этой оценки, были экспансия базальной мембраны канальцев, уплощение эпителиальных клеток, целостность щеточной каемки, атрофия и деформация канальцев, размер просвета канальцев, инфильтрат интерстициальными клетками, структура гломерулярного пучка, мезангиальная экспансия, гломерулярный инфильтрат, гломерулярное мочевое пространство, базальная мембрана гломерул и экспансия мезангиального матрикса.

Анализ изображений Definiens и гистологическая оценка изображений также применимы для срезов почек после введения адриамицина.

Анализ фиброза по внеклеточному матриксу человека *in vitro*

а) Клеточная культура

Все анализы накопления внеклеточного матрикса (ECM) проводили в 384-луночных черных планшетах с прозрачным дном (Greiner, каталожный номер #781090), где среда, количество клеток/лунка, время инкубации и стимул варьировались в зависимости от используемого типа первичных клеток.

Сокультуру звездчатых клеток печени человека (NHSteC) (ScienCell, каталожный номер sc-5300) (пассаж 4) и

внутрипеченочных билиарных эпителиальных клеток человека (ScienCell, каталожный номер sc-5100) (пассаж 3) высевали в количестве 1000 клеток/лунка (соотношение 1:1) в 25 мкл среде для эпителиальных клеток, свободной от фенолового красного (EpiCM-prf) с добавками (ScienCell, каталожный номер sc-sc-4101-prf). Звездчатые клетки человека (ScienCell) в монокультуре высевали в количестве 1000 клеток/лунка в среду для звездчатых клеток (ScienCell) и сокультуру звездчатых клеток и гепатоцитов (ScienCell) высевали в количестве 1000 клеток/лунка (соотношение 1:1) в смешанной культуральной среде (ScienCell).

Фибробласты тонкого кишечника человека (ScienCell) высевали в количестве 2000 клеток/лунка в основной среде для эпителиальных клеток почек +0,5%FCS и добавки (ATCC).

Фибробласты дермы кожи человека выращивали в среде для роста фибробластов и кератиноциты человека выращивали в среде для кератиноцитов и высевали в количестве 1500 клеток/лунка. Сокультуру фибробластов и кератиноцитов (соотношение 9:1) выращивали в смеси 1:1 и высевали в количестве 1500 клеток/лунка.

Эпителиальные клетки проксимальных канальцев почки человека (RPTEC, Innoprot) и фибробласты почки человека (HRF, InnoProt) высевали в количестве 2000 клеток на лунку (соотношение 1:1) в сокультуре с использованием основной среды эпителиальных клеток почки (ATCC)+0,5% FCS и добавки (ATCC).

Эпителиальные клетки мелких дыхательных путей человека (ATCC) выращивали в основной среде для роста с добавками из набора для роста эпителиальных клеток бронхов (ATCC) и фибробласты легкого IPF134 (ATCC) выращивали в среде для выращивания фибробластов (Lonza). Сокультуру высевали в количестве 2000 клеток/лунка (соотношение 1:1).

в) Измерение роста клеток

После инкубации в течение 7 суток при 37°C, 5% CO₂, рост клеток оценивали с использованием реагента PrestoBlue® Cell Viability reagent (Thermo Fischer Scientific) в соответствии с инструкциями изготовителя.

с) Измерение накопления ЕСМ

Количественное определение индивидуальных компонентов ЕСМ: иммунофлуоресценция

После инкубации в течение 7 суток при 37°C в 5% CO₂ клетки промывали в PBS и лизировали 20 мкл/лунка 0,25 М NH₄OH/25 мМ Tris (Sigma-Aldrich) в течение 15 мин при 37°C. Затем матрикс промывали 3 раза в PBS, фиксировали в 40 мкл 100% метанола в течение 30 мин при -20°C и промывали 3 раза в PBS, а затем окрашивали с использованием антител против фибронектина (eBiosciences), коллагена I (Millipore), коллагена III (Millipore), коллагена IV (eBiosciences) и коллагена V (Abcam). Планшеты сканировали на устройстве для считывания Arrayscan HC (Cellomics) с использованием 3-канального протокола с помощью приложения для определения биологического профиля "Cellomics CellHealth" и объектива 10× (новая камера X1) с биннингом 2×2 (1,10⁴×1,10⁴ пикселей/поле).

Измерение общих компонентов ЕСМ: окрашивание Flamingo™

Планшеты для определения иммунофлуоресценции промывали 3 раза водой Flowfusor, а затем окрашивали с использованием флуоресцентного реагента телеобразного красителя Flamingo™ (BioRad) в соответствии с инструкциями изготовителя. Планшеты сканировали на устройстве для считывания Arrayscan HC (Cellomics) с использованием 2-канального протокола с помощью приложения для определения биологического профиля "Cellomics CellHealth" и объектива 10× (новая камера X1) с биннингом 2×2 (1,10⁴×1,10⁴ пикселей/поле).

Способ получения 3D-гломерулярного сфероид человека

Получение и обработка сфероида

Nano-shuttle-PL (каталожный номер # 657841) добавляли в колбы T75 со стабильно трансфицированным меченным GFP актином, кондиционально иммортализованными инфицированными SV40 подоцитами и гломерулярными эндотелиальными клетками человека (HRGEC), предоставленными University of Bristol, выращиваемыми в RPMI 1640 (10% FCS, 5 мл L-глутамина и 1XITS, Gibco), и средой

EBM-2 с набором с добавками от Lonza (Cat # CC4147), соответственно. Трансфицированные GFP подоциты подтверждали посредством FACS. Все клетки собирали с использованием TrypLE Express (Gibco) и намагниченные HRGEC высевали в количестве 5000 клеток/лунка в 96-луночных планшетах Greiner с низкой адгезией (каталожный номер # 655976). Greiner Spheroid Drive (каталожный номер # 655830) помещали под 96-луночный планшет на 6 ч и сфероиды выращивали в среде EBM-2 при 37°C/5% CO₂ /влажности 100%. Drive удаляли и намагниченные GFP-подоциты высевали в количестве 5000 клеток/лунка. Drive возвращали вниз на ночь и сфероиды подвергали дифференцировки в течение 10 суток, подпитывая каждые 3 суток с использованием Holding Drive. Затем сфероиды обрабатывали плазмой FSGS человека в конечной концентрации 15%, плюс или минут IL-28A (10000 нг/мл) или только средой в течение 7 суток.

Фиксация и окрашивание

Сфероиды фиксировали и подвергали повышению проницаемости в течение 3 часов при 4°C в 10% формалине/1% Triton X-100/PBS. После промываний 3×10 мин PBS сфероиды дегидратировали в серии возрастающих концентраций метанола при 4°C в PBS: 25%, 50%, 75%, 95% в течение 30 минут каждый раз и оставляли в 100% метаноле на ночь. Сфероиды гидратировали в той же серии нисходящих концентраций и промывали, как описано выше, в PBS, а затем блокировали PBST (0,1% Triton X-100 в PBS), содержащем 3% BSA в течение ночи при 4°C. После промываний PBST 4×30 мин, добавляли вторичные антитела (1:500/ PBST: Alexa GAR-AF647 и GAM-AF555). Для усиления сигнала GFP добавляли антитело против GFP-AF488 в количестве 1:200 на 24 ч. Сфероиды промывали (4×30 мин/PBST), а затем получали изображения с использованием YokoGawa confocal quantification 1 (CQ1) при увеличении X20.

Количественное определение площади маркера подоцитов

Проекции с максимальной интенсивностью импортировали в Definiens Developer XD 64 и анализировали с использованием иммунофлуоресцентного модуля. Области сфероидов вручную обозначали и определяли пороговые уровни для индивидуальных

маркеров и запускали алгоритм анализа для определения маркерных областей выше пороговой интенсивности для каждого маркера. Площадь каждого маркера выше пороговой интенсивности определяли в качестве доли площади сфероида.

РЕЗУЛЬТАТЫ

(1) Модель хронического заболевания почек на мышах, индуцируемая адриамицином (CKD)

IL-28A мыши (IFNL2) первоначально был идентифицирован в скрининге модифицирующих фиброз белков в модели с адриамицином CKD на мышах в качестве одного представителя гидродинамически трансфицируемой пары кДНК (n=15 мышей). Трансфицированная пара снижала фиброз почки при измерении по общему уровню гидроксипролина в почках на 51% относительно контрольной группы с трансфекцией солевым раствором ($p=0,02$) (фиг.1(a) и (b)) и нормализовала функцию почек на основе сывороточных уровней креатинина ($p<0,05$) (фиг.1(c)). Противофиброзные эффекты IL-28A были подтверждены в повторном исследовании, в котором трансфицировали кДНК IL-28A независимо в той же модели (n=22 мышей на группу). IL-28A снижал фиброз почек при измерении по общему уровню гидроксипролина в почках на 48% относительно контрольной группы солевого раствора ($p=0,0004$) (фиг.(a) и (b)), в то время сниженная функция почек возвращалась к нормальному диапазону при измерении по сывороточному креатинину (среднее значение уровня сывороточного креатинина=1 мкг/мл в группе IL-28A по сравнению с 4,8 мкг/мл в контрольной группе с адриамицином и солевым раствором без лечения ($p<0,0001$); среднее значение уровня сывороточного креатинина в наивной группе=0,8 мкг/мл) (фиг.2(c)). Кондициональная выживаемость при определении по симптомам последней стадии почечной недостаточности возрастала от 50% в группе адриамицина, в которой вводили солевой раствор, до 85% в группе, трансфицированной IL-28A мышью (фиг.2(d)). Через 49 суток все почки от выживших мышей ((наивные (n=8), животные, которым вводили адриамицин, без лечения (n=20) и животные, подвергнутые гидродинамической трансфекции IL-28A (n=19)) фиксировали, заливали парафином, нарезали на срезы и окрашивали либо трихромом Массона (MT), либо пикросириусом

красным (PSR) и визуализировали на сканере предметных стекол Hamamatsu. Типичные и репрезентативные изображения окрашенных PSR почек для одного naive, трех подвергнутых введению адриамицина без лечения и трех подвергнутых введению адриамицина и подвергнутых лечению IL-28B животных представлены на фиг.5(f). Введение адриамицина вызывало отчетливый гломерулосклероз приблизительно 50% гломерул с усиленным окрашиванием PSR в основном в базальной мембране гломерул, а также мезангиальном матриксе. В интерстиции канальцев происходила устойчивая экспансия базальной мембраны более чем в 70% коры, причем большое количество канальцев демонстрировали уплощенный эпителий, вызывающий значительную утрату архитектуры канальцев с огромным расширением канальцев, которое приводило к большому просвету без щеточной каемки. Эти области имеют инфильтрацию клеток от мягкой до умеренной.

Применение IL-28A практически полностью предотвращало признаки гломерулосклероза с небольшими признаками утолщения базальной мембраны гломерул. Только у 2 из 22 животных были продемонстрированы заметные признаки сглаживания эпителия и увеличение просвета, характерные для животных без лечения. Остальные животные имели интерстиций канальцев, который выглядел практически нормальным в более чем 80% коры с небольшим эффектом на базальную мембрану канальцев.

47 образцов почки мыши, которые были окрашены PSR, подвергали многопараметрическому анализу изображений с использованием программного обеспечения Definiens и площадь окрашивания PSR, измеренную для трех групп, наносили на график в качестве процента окрашенной PSR площади (фиг.5(g)). Те же 47 предметных стекол со срезами почек мыши подвергали патологической оценке вслепую в отношении степени фиброза двумя индивидуумами, специализирующимися на патологии почек. Научный эксперт в области почек оценивал окрашенные PSR предметные стекла с использованием оценочной шкалы из 0-10 точек (0 демонстрирует отсутствие фиброза и 10 демонстрирует наивысший фиброз). Лечение посредством IL-28A продемонстрировало значительное снижение, составляющее 47%, показателя патологии

($p < 0,0001$) по сравнению с группой без лечения (фиг.5(h)). Второй научный эксперт в области почек оценивал 47 окрашенных МТ предметных стекол с использованием шкалы 1-10 (1 демонстрирует отсутствие фиброза и 10 соответствует наивысшему фиброзу). Группа, в которой проводили лечение IL-28A, продемонстрировала явное улучшение уровня фибротического ремоделирования ($p < 0,0001$) относительно группы без лечения (фиг.5(i)).

IL-28B мыши (IFNL3) также первоначально был идентифицирован в скрининге модифицирующих фиброз белков в модели СКД с адриамицином в качестве одного представителя гидродинамических трансфицированной пары кДНК (n=15 мышей на группу). Трансфицированная пара снижала фиброз почки при измерении по общему уровню гидроксипролина в почках на 59% относительно контрольной группы с трансфекцией солевым раствором ($p = 0,00086$) (фиг.3(a) и (b)) и нормализовала функцию почек на основе сывороточных уровней креатинина (не значимо) (фиг.3(c)). Противофиброзные эффекты IL-28B были подтверждены в повторном исследовании, в котором трансфицировали кДНК IL-28B независимо в той же модели (n=22 мышей на группу). Фиброз почек при определении по общему уровню гидроксипролина в почках снижался на 65% относительно контрольной группы солевого раствора ($p = 0,0000018$) (фиг.4(a) и (b)), в то время сниженная функция почек возвращалась к норме по сравнению со значительным увеличением в контрольной группе, в которой вводили солевой раствор, без лечения (среднее значение уровня сывороточного креатинина = 1,2 мкг/мл в группе IL-28B по сравнению со средним значением 3,2 мкг/мл в контрольной группе с адриамицином и солевым раствором без лечения ($p < 0,05$); среднее значение уровня сывороточного креатинина в наивной группе = 0,8 мкг/мл) (фиг.4(c)). Кондициональная выживаемость возрастала от <50% у животных, которым вводили адриамицин, без лечения, до 100% у мышей, которым вводили IL-28 B (фиг.4(d)). Через 49 суток все почки от выживших мышей ((наивные (n=10), животные, которым вводили адриамицин, без лечения (n=18) и животные, подвергнутые гидродинамической трансфекции IL-28B (n=22)) фиксировали, заливали парафином, нарезают на срезы и окрашивали либо

гематоксилином и эозином (H&E), либо пикросириусом красным (PSR) и визуализировали на сканере предметных стекол Hamamatsu. Типичные и репрезентативные изображения окрашенных PSR почек для одного наивного, трех подвергнутых введению адриамицина без лечения и трех подвергнутых введению адриамицина и подвергнутых лечению IL-28B животных представлены на фиг.5(a). Почки мышей, не подвергнутых лечению, имели обширный гломерулосклероз и тубулоинтерстициальный фиброз с заметной экспансией базальной мембраны канальцев, сглаживанием эпителия канальцев, обширным расширением канальцев с утратой щеточной каемки и атрофией канальцев. Напротив, мыши, которых лечили IL28B, были по большей части защищены от обоих типов фибротического ремоделирования. 50 образцов почки мыши, которые были окрашены PSR, подвергали многопараметрическому анализу изображений с использованием программного обеспечения Definiens и площадь окрашивания PSR, измеренную для трех групп, наносили на график в качестве процента окрашенной PSR площади (фиг.5(b)). Площадь окрашивания PSR в группе, подвергнутой лечению IL-28B, нормализовывалась ($p < 0,0001$) относительно 3-кратного увеличения в почках в отсутствие лечения. Те же 50 предметных стекол со срезами почек мыши подвергали патологической оценке вслепую в отношении степени фиброза тремя индивидуумами, специализирующимися на патологии почек. Клинический патолог оценивал предметные стекла, окрашенные H&E, с использованием оценочной системы по шкале 0-4 балла (0 демонстрирует отсутствие фиброза и 4 демонстрирует наивысший фиброз). Лечение посредством IL-28B продемонстрировало значительное снижение, составляющее 45%, показателя патологии ($p < 0,01$) по сравнению с группой без лечения (фиг.5(c)). Два научных эксперта в области почек оценивали 50 окрашенных PSR предметных стекол с использованием оценочной шкалы из 0-10 точек (0 демонстрирует отсутствие фиброза и 10 демонстрирует наивысший фиброз). Группа, в которой проводили лечение IL-28B, вновь продемонстрировала заметное улучшение в отношении уровня фибротического ремоделирования ($p < 0,0001$) относительно группы без лечения (фиг.5(d) и (e)).

(2) Модели фиброза органа *in vitro* на первичных клетках

человека**(2.1) Фиброз печени**

Первичные звездчатые клетки человека, выращиваемые на пластмассе, являются самоактивирующимися и накапливают значительный базовый уровень внеклеточного матрикса при определении по уровням белков ЕСМ фибронектина, коллагена IV и коллагена I и III. Это накопление ЕСМ может ингибироваться обработкой культуры рекомбинантным IL-28A дозозависимым образом (фиг.6(a)). Сокультивирование первичных звездчатых клеток человека и первичных гепатоцитов человека (соотношение 1:1) обеспечивает базальный внеклеточный матрикс, который также может ингибироваться обработкой рекомбинантным IL-28A человека дозозависимым образом со снижением уровня фибронектина, коллагена IV и коллагена I и III (фиг.6(b)).

Стимуляция посредством $TGF\beta 1$ как монокультуры звездчатых клеток, так и сокультуры звездчатых клеток и гепатоцитов, индуцировала дальнейшее повышение уровня белков ЕСМ, фибронектина, коллагена IV и коллагена I и III. Обработка $TGF\beta 1$ -стимулированной монокультуры звездчатых клеток или сокультуры звездчатых клеток и гепатоцитов либо IL-28A, либо IL-28B продемонстрировала практически полное ингибирование какого-либо повышения уровня какого-либо из белков ЕСМ в наиболее высокой концентрации IL-28A или B 10 мкг/мл, причем в обоих случаях ингибирование происходило дозозависимым образом. IL-28A был более эффективным, чем IL-28B, среди всех белков ЕСМ в $TGF\beta 1$ -стимулируемых клетках печени (фиг.7(a) и (b)). Изображение ЕСМ $TGF\beta 1$ -стимулированной сокультуры в присутствии либо IL-28A, либо IL-28B демонстрирует заметное уменьшение количества ЕСМ по сравнению с обработкой $TGF\beta 1$ отдельно, что согласуется с количественным определением с помощью анализа изображений (фиг.8).

(2.2) Фиброз тонкого кишечника

Фибробласты тонкого кишечника человека, стимулированные $TGF\beta 1$ (10 нг/мл), индуцируют белки внеклеточного матрикса, фибронектин и коллаген I и III. Уровень фибронектина в

значительной степени ингибировался посредством IL-28A, IL-28B и IL-29 (10 нг/мл), с ингибирование 76%, 73%, и 83%, соответственно, относительно контрольной стимуляции посредством TGF β 1. Коллаген I и III ингибировался посредством IL-28A, IL-28B и IL-29 (10 нг/мл), на 48%, 33% и 35%, соответственно. Коллаген IV значительно ингибировался только посредством IL-28A (ингибирование на 37% в дозе 10 мкг/мл) относительно контрольной стимуляции посредством TGF β 1 (фиг.9).

(2.3) Фиброз кожи

Первичные фибробласты дермы человека в сокультуре с первичными кератиноцитами (соотношение 9:1) накапливают значительное количество фибронектина, коллагена I и III и коллагена IV непосредственно перед сокультивированием. С использованием 3 отдельных партий фибробластов в комбинации с кератиноцитов одного донора, культуры обрабатывали посредством либо IL-28A, либо IL-28B. Процентное ингибирование белков ЕСМ относительно культур без обработки количественно определяли для всех 3 партий фибробластов и среднее ингибирование наносили на график (фиг.10). Как IL-28A, так и IL-28B полностью ингибировали все 4 матриксных белка в наибольшей концентрации 10 мкг/мл со сходной эффективностью. Как IL-28A, так и IL-28B продемонстрировали дозозависимое ингибирование маркера ЕСМ Col IV в концентрации между 10 и 10000 нг/мл. Жизнеспособность клеток тестировали с использованием анализа Prestobblue, продемонстрировавшего, что ни IL-28A, ни IL-28B не были токсичными ни в одной протестированной концентрации (фиг.10).

Сокультуру фибробластов дермы и кератиноцитов обрабатывали IL-29, IL-28A и IL-28B в более узком диапазоне концентраций, составлявшем 1250-10000 нг/мл. Это продемонстрировало дозозависимое ингибирование фибронектина, коллагена I и III и коллагена IV относительно контрольной сокультуры (фиг.11). Коллаген IV в наибольшей степени ингибировался посредством IFNL во всех протестированных концентрациях (фиг.11). Обработка IL-29, IL-28A или IL-28B не влияла на жизнеспособность клеток при определении с помощью анализа жизнеспособности клеток Presto

Blue (фиг.11).

Изображения необработанных сокультур дермы по сравнению с сокультурами, обработанными IL-29, IL-28A и IL-28B в концентрациях как 1250 нг/мл, так и 10000 нг/мл, подтвердили тотальное предотвращение накопления ЕСМ при определении с использованием анализа изображений в присутствии 10 мкг/мл IFNL (фиг.12).

Наконец, фибробласты дермы человека стимулировали в монокультуре посредством IL-1 α (10 нг/мл) для индукции белков ЕСМ фибронектина, коллагена I и III и коллагена IV. Обработка стимулированных IL-1 α монокультур фибробластов посредством IL-28A или IL-28B продемонстрировала мощное ингибирование способствующего образованию матрикса ответа для всех белков ЕСМ с полным ингибированием матрикса при наивысшей концентрации 10 мкг/мл. IL-28A был более эффективным, чем IL-28B, во всех партиях фибробластов, и один репрезентативный пример представлен (фиг.13). IL-28A или IL-28B не имели эффекта на жизнеспособность клеток при определении посредством Prestobluе (фиг.13).

(2.4) Фиброз почек

Первичные эпителиальные клетки канальцев почки (RPTEC) человека, находящиеся в сокультуре с первичными фибробластами почки (посеянные в количестве 2000 клеток/лунка в соотношении 1:1) образуют выраженный ЕСМ с высоким содержанием фибронектина и коллагена I и III. Эту сокультуру обрабатывали IL-29, IL-28A или IL-28B с использованием 3 различных протоколов добавления цитокинов.

Во-первых IL-29, IL-28A и IL-28B добавляли к сокультуре клеток почки на 0 сутки и культуру инкубировали в течение 7 суток. Все 3 цитокина эффективно ингибировали дозозависимым образом накопление фибронектина и коллагена I и III (фиг.14(a)). IL-29 продемонстрировал наиболее выраженные эффекты с небольшим различием между IL-28A и IL-28B. Обработка цитокинами не снижала жизнеспособность клеток ((фиг.14(a))).

Во-вторых IL-29, IL-28A и IL-28B добавляли к клеткам RPTEC на 0 сутки, фибробласты добавляли через 24 часа, а затем

культивированию позволяли продолжаться в течение всего 7 суток, после чего количественно определяли ЕСМ. В данном случае, все из IL-29, IL-28A и IL-28B вновь ингибировали дозозависимым образом накопление фибронектина и коллагена I и III (фиг.14(b)). Степень ингибирования белков ЕСМ в присутствии IFNL была большей, когда цитокины добавляли к RPTEC за 24 часа до инициации в сокультуре для индукции ЕСМ посредством добавления к фибробластам, а не к обоим типам клеток одновременно (см. для сравнения фиг.14(a) и фиг.14(b)).

Наконец, IL-29, IL-28 и IL-28B добавляли к фибробластам на 0 сутки. Через двадцать четыре часа добавляли RPTEC и сокультивирование продолжали в течение всего 7 суток, после чего проводили количественное определение фибронектина и коллагена I и III. Добавление IFNL к фибробластам сначала также продемонстрировало значительное ингибирование белков ЕСМ (фиг.14(c)), но снижало эффективность IL-29, IL-28A и IL-29B по сравнению как с добавлением цитокинов на 0 сутки к сокультуре, так и с добавлением цитокинов к RPTEC за 24 часа до фибробластов. Это наблюдение указывает на опосредуемый IL-28R1 сигнальный ответ в RPTEC, опосредующий противофиброзный фенотип, который приводит к ингибированию сигнала ЕСМ в сокультуре как эпителиальных, так и фибробластных типов клеток. Чтобы отчетливо продемонстрировать дифференциальный эффект порядка добавления IFNL к различным типам клеток относительно одновременного добавления, данные IL-28A, IL-28B и IL-29 вновь наносили на график для фибронектина (фиг.15(a)) и для Col I и III (фиг.15(b)), демонстрирующий относительный эффект различных протоколов добавления на уровни ингибирования для каждого индивидуального лиганда IL-28R1. При определенных более низких концентрациях IL-28A, IL-28B или IL-29, различие между одновременным добавлением клеток и цитокинов по сравнению с добавлением сначала к RPTEC (до фибробластов), достигло статистической значимости, и эти величины обозначены на графиках.

Жизнеспособность клеток не нарушалась в результате добавления цитокинов сначала к RPTEC или фибробластов до

чередования клеток в сокультуре, при определении с помощью Presto blue (фиг.14(a), (b) и (c)).

Репрезентативные изображения (одно из всего 16 полей на обработку) необработанной сокультуры по сравнению с обработанными IL-28A, IL-28B и IL-29 сокультурами демонстрируют дозозависимые эффекты IL-29, IL-28A и IL-28B и практически полное ингибирование, наблюдаемое в присутствии 1000 нг/мл IL-29 (фиг.16), подтверждая данные анализа изображений.

Эпителиальные клетки проксимальных канальцев почек (RPTEC) в монокультуре откладывают белки базального ЕСМ при выращивании на пластмассе, хотя и на низких уровнях. Низкие уровни ЕСМ все еще могут ингибироваться в присутствии очень низких концентраций IL-29, как показано для фибронектина, коллагена IV и коллагена I и III на фиг.22.

(2.5) Фиброз легких

Эпителиальные клетки мелких дыхательных путей легкого человека в сокультуре с фибробластами легкого от пациента с идиопатическим фиброзом легких (IPF) (2000 клеток/лунка в соотношении 1:1) образовывали выраженный тотальный ЕСМ (при измерении с помощью окрашивания Flamingo) после 7 суток в культуре. и они были положительными по маркерам ЕСМ фибронектину, коллагену I и III и коллагену IV. IL-28A или IL-28B не имели выраженного эффекта на уровень фибронектина. Однако IL-28B продемонстрировал значительное ингибирование коллагена I и III, коллагена IV и окрашивания Flamingo при наивысшей концентрации 10 мкг/мл (фиг.17). Однако эффекты IL-28A были менее выраженными. Отсутствовало изменение жизнеспособности клеток через 7 суток в случае как IL-28A, так и IL-28B (фиг.17).

(3) Модели фиброза органах на первичных клетках человека

(3.1) Фиброз печени

Сокультивирование первичных звездчатых клеток человека с первичными внутрипеченочными билиарными эпителиальными клетками человека (соотношение 1:1) обеспечивает базальный внеклеточный матрикс, который также может ингибироваться обработкой рекомбинантным IL-28A и IL-29 человека дозозависимым образом со снижением уровней фибронектина, коллагена IV и коллагена I и III

(фиг.19) .

(3.2) 3D-модель гломерулярного сфероиды

Гломерулярные сфероиды конструировали из внутренней центральной части, образованной намагниченными первичными эндотелиальными клетками гломерул человека, и наружной части из зависимых от температуры подоцитов человека, которые могут поддерживаться в стабильной культуре в течение 3 недель. Обработка гломерулярных сфероидов посредством 15% плазмы от пациентов с фокальным сегментным гломерулосклерозом (FSGS) в фазе рецидива индуцировала потерю GFP-меченных подоцитов из наружной части, которые могли быть защищены в присутствии IL-28A. Плазма от здоровых добровольцев не имела эффекта на подоциты. Количественное определение площади маркера подоцитов – зеленого флуоресцентного белка, продемонстрировал значительное снижение в присутствии плазмы FSGS в фазе рецидива, которая значительно возрастала при обработке посредством IL-28A (фиг.20(a), (b) и (c)). Клиническое прогрессирование FSGS характеризуется уплощением и потерей подоцитов. Эта модель воссоздает эффект подоцитов в результате циркулирующего фактора в плазме FSGS и указывает на возможность переноса в клинику терапии IL-28 для предупреждения ассоциированного нефротического синдрома и гломерулосклероза.

(4) Модель фиброза почек с использованием односторонней закупорки мочеточника мыши (UUO)

(4.1) IL28B мыши, доставляемый посредством гидродинамической трансфекции (HDT)

Почки с UUO у животных, которым вводили контрольный вектор с SEAP посредством HDT, продемонстрировали тубулоинтерстициальный фиброз в коре, типичный для этой модели, через 21 сутки после хирургической операции, с широкой экспансией базальной мембраны канальцев, выраженным окрашиванием коллагена, причем базальная мембрана особенно выражено окрашивалась в мозговом пучке, широко выраженным снижением объема эпителиальных клеток, атрофией канальцев, утратой щеточной каемки проксимальных канальцев и обширным тубулоинтерстициальным инфильтратом. Менее 15% канальцев имели

практически нормальную архитектуру. Мозговое вещество было эффективно разрушено и отсутствовало, в то время как изменения гломерул были минимальными (фиг.21(а)).

Почки UUO у животных, подвергнутых HDT с IL-28В мыши за 1 сутки до UUO и через 7 суток после UUO в обоих случаях продемонстрировали защиту от тубулоинтерстициального фиброза коры через 21 сутки после хирургической операции (фиг.21(а)). Экспансия базальной мембраны канальцев и окрашивание коллагена были по меньшей мере на 30%-40% ниже в обеих группах, в которых вводили IL-28В мыши посредством HDT, чем у мышей с UUO, которым вводили контрольный вектор. В обеих группах IL28В сохранялась архитектура канальцев с меньшим сглаживанием эпителия и возникновением атрофии. От 30 до 40% канальцев продемонстрировали практически нормальную структуру у мышей, которым проводили HDT, начиная с суток -1 до HDT, и немного меньшее количество (от 20 до 30%) у мышей с более поздним лечением. Интерстициальная инфильтрация составляла приблизительно 40% в обеих группах IL-28 по сравнению с группой контрольного вектора. Ни одна из групп IL28 не имела какой-либо заметной защиты структуры мозгового вещества. В целом, как ранняя, так и поздняя доставка IL28В посредством HDT обеспечивала значительную защиту от индуцированного UUO фиброзного ремоделирования коры почки.

Срезы с окрашенным пикросириусом красным (PSR) коллагеном подвергали количественному определению с использованием алгоритма анализа изображений Definiens, и был показан статистически значимый защитный эффект IL-28В мыши, доставляемого либо на сутки -1, либо на сутки 7, при нанесении на график либо в качестве общей площади коллагена (фиг.21(б)), либо в качестве площади высокоинтенсивного окрашивания коллагена (фиг.21 (с)) относительно мышей, которым вводили контрольную плазмиду. Это согласуется с визуальной гистологической оценкой окрашенных срезов, как описано выше.

Сывороточные уровни белка IL28В мыши, достигнутые через 21 сутки после HDT в модели на мышах с UUO, количественно определяли посредством ELISA, и они составляли от 43 до 485

нг/мл среди всех групп. Нельзя было измерить белок IL28B мышцы у контрольных мышей с HDT посредством SEAP, так что его уровни составляли менее 4 нг/мл, которые были нижним пределом количественного определения (LLQ) использованного анализа.

(4.2) IL-29 человека, доставляемый посредством гидродинамической трансфекции (HDT)

IL-29 человека, доставляемый посредством HDT, демонстрирует выраженную экспрессию белка у всех мышей как на 0 сутки (через 24 часа после трансфекции), так и на 19 суток, когда мышей в этой модели умерщвляли, по сравнению с группой, в которой вводили контрольную плазмиду SEAP (фиг.23(a)). IL-29 человека не определялся в сыворотке нетрансфицированных мышей или контрольных мышей с SEAP.

UUO без лечения через 19 суток демонстрирует типичные гистологические изменения для этой модели. Происходит выраженная деструкция и потеря почечного мозгового вещества во всех почках. Кора демонстрирует выраженную экспансию базальной мембраны канальцев со значительным накоплением интерстициального коллагена, на что указывает окрашивание пикросириусом красным (PSR). Также происходит заметная инфильтрация клеток в интерстиций по всей коре. Структура эпителия канальцев значительно повреждается. Большинство эпителиальных клеток утрачивают объем и в основном выглядят сглаженными, включая небольшое количество канальцев с расширенным просветом. Следует отметить, что более 80% канальцев претерпевают выраженную атрофию и во многих случаях полностью разрушаются. Просвет канальцев в большинстве случаев трудно отличить вследствие утраты проходимости, причем эпителиальные клетки явно смещаются от базальной мембраны канальцев нефрона и находятся в том, что должно было быть просветом.

Почки UUO на 19 суток, в случае которых проводилось введение IL-29 с момента, имеют значительно отличающийся внешний вид от почек, в случае которых вводился только вектор SEAP, с отчетливо сохраненной структурой. Мозговое вещество повреждено, но сохраняется и имеет более отличимую структуру, чем в случае UUO без лечения, у 75% животных. В коре основным наблюдением при

более низких уровнях увеличения является большое количество канальцев, которые имеют расширенный просвет канальцев, по сравнению с UUO в случае SEAP. Однако, если это обычно ассоциировано с очень стлаженными эпителиальными клетками и экспансией базальной мембраны канальцев в случае UUO без лечения, в случае лечения IL-29 эпителиальные клетки имеют сохраненный объем, экспансия базальной мембраны канальцев является минимальной и архитектура канальцев в значительной степени сохраняется небольшим количеством или отсутствием признаков атрофии и коллапса канальцев. Уровни интерстициального коллагена являются заметно более низкими и экспансия базальной мембраны канальцев является сниженной. В общем, применение IL-29 значительно снижало тубулоинтерстициальный фиброз, вызываемый UUO, с меньшим интерстициальным коллагеном и выраженным сохранением архитектуры канальцев, на что указывают репрезентативные изображения на фиг.23(b).

Все срезы с окрашенным пикросириусом красным (PSR) коллагенам подвергали количественному определению с использованием алгоритма анализа изображений Definiens, продемонстрировавшего статистически значимый защитный эффект IL-29 человека, доставляемого на сутки -1, при нанесении на график в качестве общей площади окрашенного коллагена относительно мышей, которым вводили контрольную плазмиду SEAP (фиг.23(c)). Это согласуется с визуальной гистологической оценкой окрашенных срезов, как описано выше.

SEQUENCE LISTING

<110> UCB Biopharma SPRL
Five Prime Therapeutics, Inc.

<120> ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ ИНТЕРФЕРОНА-ЛЯМБДА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗА

<130> N412246WO

<140> PCT/EP2017/083949

<141> 2017-12-20

<150> GB 1621728.3

<151> 2016-12-20

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	Cys	His
1				5					10					15	

Ile	Gly	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	Phe	Lys
		20						25					30		

Lys	Ala	Arg	Asp	Ala	Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Asn	Trp	Ser
	35						40					45			

Cys	Ser	Ser	Pro	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Trp	Asp	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln
	50					55					60				

Val	Arg	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu
65					70					75					80

Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Val	Leu	Asp
				85					90					95	

Gln	Pro	Leu	His	Thr	Leu	His	His	Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Ala	Cys
		100						105					110		

Ile	Gln	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Arg	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	His
		115					120					125			

His	Trp	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Lys	Glu	Ser	Ala	Gly
	130					135					140				

Cys	Leu	Glu	Ala	Ser	Val	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Arg	Leu	Leu	Thr	Arg
145					150					155					160

Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr
165 170 175

His Pro Glu Ser Thr
180

<210> 2
<211> 856
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 2
aattaccttt tcactttaca cacatcatct tggattgccc attttgctg gctaaaaagc 60
agagccatgc cgctggggaa gcagttgcga tttagccatg gctgcagctt ggaccgtggt 120
gctggtgact ttggtgctag gcttggccgt ggcaggccct gtccccactt ccaagcccac 180
cacaactggg aagggtgcc acattggcag gttcaaactc ctgtcaccac aggagctagc 240
gagcttcaag aaggccaggg acgccttgga agagtcactc aagctgaaaa actggagttg 300
cagctctcct gtcttccccg ggaattggga cctgaggctt ctccagggtga gggagcgccc 360
tgtggccttg gaggtgagc tggccctgac gctgaaggctc ctggaggccg ctgctggccc 420
agccctggag gacgtcctag accagcccct tcacaccctg caccacatcc tctcccagct 480
ccaggcctgt atccagcctc agcccacagc agggcccagg ccccgggggc gcctccacca 540
ctggctgcac cggctccagg agggccccc aaaggagtcc gctggctgcc tggaggcatc 600
tgtcaccttc aacctcttcc gcctcctcac gcgagacctc aaatatgtgg ccgatgggaa 660
cctgtgtctg agaacgtcaa cccaccctga gtccacctga cccccacac cttatttatg 720
cgctgagccc tactccttcc ttaatttatt tcctctcacc ctttatttat gaagctgcag 780
ccctgactga gacatagggc tgagtttatt gttttacttt tatacattat gcacaaataa 840
acaacaagga attgga 856

<210> 3
<211> 175
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Pro Val Ala Arg Leu His Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys
1 5 10 15

His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe
20 25 30

Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp Cys
35 40 45

Arg Cys His Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu
50 55 60

Gln Val Arg Glu Arg Pro Met Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
65 70 75 80

Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Val Asp
85 90 95

Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Phe
100 105 110

Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly
115 120 125

Arg Leu His His Trp Leu Tyr Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu
130 135 140

Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu
145 150 155 160

Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
165 170 175

<210> 4
<211> 734
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 4
tgggtgacag cctcagagtg tttcttctgc tgacaaagac cagagatcag gaatgaaact 60
agacatgact ggggactgca cgccagtgc ggtgctgatg gccgcagtgc tgaccgtgac 120
tggagcagtt cctgtcgcca ggctccacgg ggctctcccg gatgcaaggg gctgccacat 180
agcccagttc aagtccctgt ctccacagga gctgcaggcc tttaagaggg ccaagatgc 240
cttagaagag tcgcttctgc tgaaggactg caggtgccac tcccgcctct tcccaggac 300
ctgggacctg aggcagctgc aggtgaggga gcgccccatg gctttggagg ctgagctggc 360
cctgacgctg aaggttctgg aggccaccgc tgacactgac ccagccctgg tggacgtctt 420
ggaccagccc cttcacaccc tgcaccatat cctctcccag ttccgggcct gtatccagcc 480
tcagcccacg gcagggccca ggaccgggg ccgcctccac cattggctgt accggctcca 540
ggaggcccca aaaaaggagt cccttggtg cctcgaggcc tctgtcacct tcaacctctt 600
ccgcctctc acgcgagacc tgaattgtgt tgccagtggg gacctgtgtg tctgaccctc 660
ccaccagtca tgcaacctga gattttatatt ataaattagc cacttgtctt aattttattgc 720

<210> 5
<211> 175
<212> БЕЖОК
<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly Cys
1 5 10 15

His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala Phe
20 25 30

Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Lys Asp Cys
35 40 45

Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln Leu
50 55 60

Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
65 70 75 80

Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp
85 90 95

Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu
100 105 110

Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly
115 120 125

Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu
130 135 140

Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu
145 150 155 160

Leu Thr Arg Asp Leu Asn Cys Val Ala Ser Gly Asp Leu Cys Val
165 170 175

<210> 6
<211> 656
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 6

ctgcattccc tcagctccct ttctctctgt gacacagaca tgaccgggga ctgcatgcc 60

gtgctggtgc tgatggccgc agtgctgacc gtgactggag cagttctctgt cgccaggctc 120

cgcggggctc tcccggatgc aaggggctgc cacatagccc agttcaagtc cctgtctcca	180
caggagctgc aggcctttaa gagggccaaa gatgccttag aagagtcgct tctgctgaag	240
gactgcaagt gccgctcccg cctcttcccc aggacctggg acctgaggca gctgcaggtg	300
agggagcgcc ccgtggcttt ggaggctgag ctggccctga cgctgaaggt tctggaggcc	360
accgctgaca ctgaccagc cctgggggat gtcttgacc agccccttca caccctgcac	420
catatcctct ccagctccg ggctgtatc cagcctcagc ccacggcagg gcccaggacc	480
cggggccgcc tccaccattg gctgcaccgg ctccaggagg ccccaaaaaa ggagtccct	540
ggctgcctcg aggcctctgt caccttcaac ctcttcgcc tcctcacgcg agacctgaat	600
tgtgttgcca gcggggacct gtgtgtctga cccttcgcc agtcatgcaa cctgag	656

<210> 7
 <211> 158
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Cys	Leu	Leu	Ser	His	Tyr	Arg	Ser	Leu	Glu	Pro
1				5					10					15	

Arg	Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	Arg	Asp	Arg	Tyr	Glu	Glu	Glu
		20						25					30		

Ala	Leu	Ser	Trp	Gly	Gln	Arg	Asn	Cys	Ser	Phe	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp
		35					40					45			

Pro	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Cys	Ala	Arg	Leu	Arg	His	Val	Ala	Arg	Gly
	50					55					60				

Ile	Ala	Asp	Ala	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Gly	Leu	His	Arg	Ser	Glu	Leu
65				70						75					80

Leu	Pro	Gly	Ala	Gly	Pro	Ile	Leu	Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Arg
			85						90					95	

Asp	Val	Ala	Ala	Cys	Leu	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Arg	Lys
		100						105					110		

Val	Pro	Gly	Ala	Gln	Lys	Arg	Arg	His	Lys	Pro	Arg	Arg	Ala	Asp	Ser
		115				120						125			

Pro	Arg	Cys	Arg	Lys	Ala	Ser	Val	Val	Phe	Asn	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu
	130					135					140				

Thr	Trp	Glu	Leu	Arg	Leu	Ala	Ala	His	Ser	Gly	Pro	Cys	Leu
145					150					155			

<210> 8
<211> 540
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 8
atgcggccga gtgtctgggc cgcagtggcc gcggggctgt gggtcctgtg cacggtgatc 60
gcagcggccc cccggcgctg cctgctctcg cactaccgct cgtcggagcc ccggacgctg 120
gcggctgcca aggcgctgag ggaccgctac gaggaagagg cgtcagctg ggggcagcgc 180
aactgctcct tccgccccag gagggatcct ccgcggccat cgtcctgcgc tcggctccgc 240
cacgtggccc ggggcatcgc ggacgcccag gcagtgtca gcggcctgca ccgctcggag 300
ctgctccccg gcgccggccc gatcctggag ctgctggcgg ccgcggggag ggatgtggcg 360
gcctgccttg agctggcacg gccaggctcc tccaggaagg tccccggggc ccagaagagg 420
cgtcacaaac cccggagagc ggactcgcct cggtgccgca aagccagcgt ggtcttcaac 480
ctcctgcgcc tgctcacgtg ggagctccgg ctggctgcac actctgggcc ttgcctctga 540

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Интерферон-лямбда для применения для лечения фиброза.
2. Интерферон-лямбда по п.1, где интерферон-лямбда представляет собой IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 или IFN- λ 4, или их функциональный миметик.
3. Интерферон-лямбда по п.2, где функциональный миметик представляет собой фрагмент, вариант или производное IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 или IFN- λ 4.
4. Интерферон-лямбда по п.3, где функциональный миметик является пегилированным.
5. Интерферон-лямбда по п.4, где функциональный миметик представляет собой ПЭГ-интерферон лямбда-1a.
6. Интерферон-лямбда по п.2, где функциональный миметик представляет собой антитело.
7. Интерферон-лямбда по п.2, где функциональный миметик представляет собой низкомолекулярную химическую структуру.
8. Интерферон-лямбда по любому из предшествующих п.п., где интерферон-лямбда или функциональный миметик активирует рецептор интерферона-лямбда.
9. Интерферон-лямбда по любому из предшествующих п.п., где фиброз представляет собой фиброз почек.
10. Интерферон-лямбда по любому из п.п.1-8, где фиброз представляет собой фиброз легких.
11. Интерферон-лямбда по любому из п.п.1-8, где фиброз представляет собой фиброз тонкого кишечника.
12. Интерферон-лямбда по любому из п.п.1-8, где фиброз представляет собой фиброз кожи.
13. Интерферон-лямбда по любому из п.п.1-8, где фиброз представляет собой фиброз печени.
14. Применение интерферона-лямбда для получения лекарственного средства для лечения фиброза.
15. Применение интерферона-лямбда по п.14, где интерферон-лямбда представляет собой IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 или IFN- λ 4, или их функциональный миметик.
16. Применение интерферона-лямбда по п.15, где

функциональный миметик представляет собой фрагмент, вариант или производное IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 или IFN- λ 4.

17. Применение интерферона-лямбда по п.16, где функциональный миметик является пегилированным.

18. Применение интерферона-лямбда по п.17, где функциональный миметик представляет собой ПЭГ-интерферон лямбда-1a.

19. Применение интерферона-лямбда по п.15, где функциональный миметик представляет собой антитело.

20. Применение интерферона-лямбда по п.15, где функциональный миметик представляет собой низкомолекулярную химическую структуру.

21. Применение интерферона-лямбда по любому из п.п.14-20, где интерферон-лямбда или функциональный миметик активирует рецептора интерферона-лямбда.

22. Применение интерферона-лямбда по любому из п.п.14-21, где фиброз представляет собой фиброз почек.

23. Применение интерферона-лямбда по любому из п.п.14-21, где фиброз представляет собой фиброз легких.

24. Применение интерферона-лямбда по любому из п.п.14-21, где фиброз представляет собой фиброз тонкого кишечника.

25. Применение интерферона-лямбда по любому из п.п.14-21, где фиброз представляет собой фиброз кожи.

26. Применение интерферона-лямбда по любому из п.п.14-21, где фиброз представляет собой фиброз печени.

27. Способ лечения фиброза, включающий введение терапевтически эффективного количества интерферона-лямбда.

28. Способ по п.27, где интерферон-лямбда представляет собой IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 или IFN- λ 4, или их функциональный миметик.

29. Способ по п.28, где функциональный миметик представляет собой фрагмент, вариант или производное IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 или IFN- λ 4.

30. Способ по п.29, где функциональный миметик является пегилированным.

31. Способ по п.30, где функциональный миметик представляет собой ПЭГ-интерферон лямбда-1а.

32. Способ по п.28, где функциональный миметик представляет собой антитело.

33. Способ по п.28, где функциональный миметик представляет собой низкомолекулярную химическую структуру.

34. Способ по любому из п.п.27-33, где интерферон-лямбда или функциональный миметик активирует рецептор интерферона-лямбда.

35. Способ по любому из п.п.27-34, где фиброз представляет собой фиброз почек.

36. Способ по любому из п.п.27-34, где фиброз представляет собой фиброз легких.

37. Способ по любому из п.п.27-34, где фиброз представляет собой фиброз тонкого кишечника.

38. Способ по любому из п.п.27-34, где фиброз представляет собой фиброз кожи.

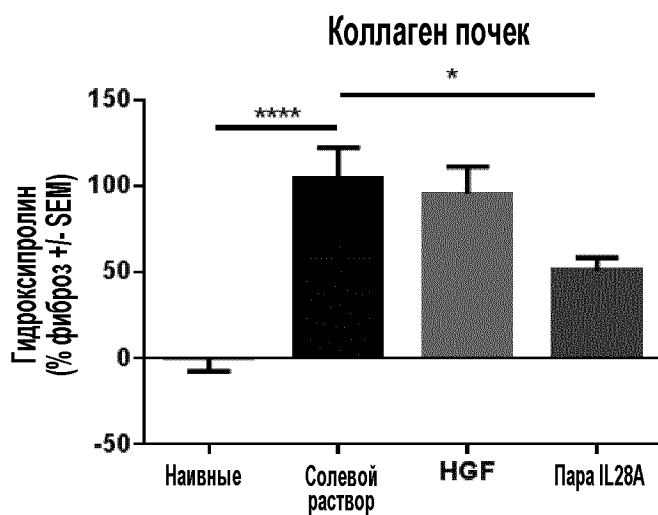
39. Способ по любому из п.п.27-34, где фиброз представляет собой фиброз печени.

40. Способ по любому из п.п.27-39, где интерферон-лямбда или функциональный миметик вводят в комбинации с другим терапевтически активным соединением.

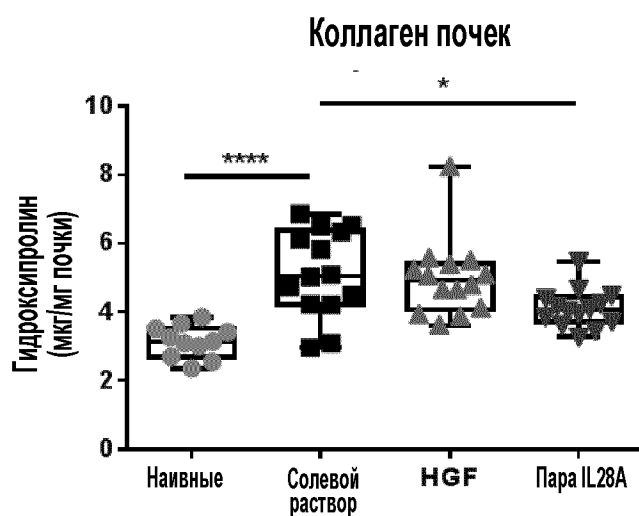
41. Способ по п.40, где другое терапевтически активное соединение представляет собой противофиброзное терапевтическое средство.

ФИГ. 1

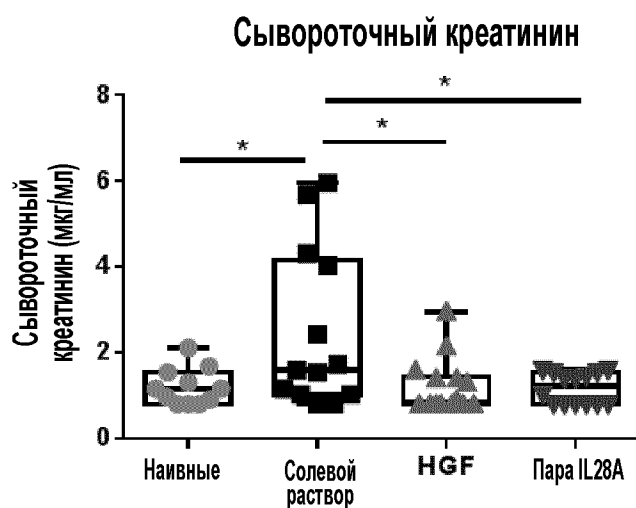
Идентификация IL-28A в качестве противофиброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином



ФИГ. 1(a)



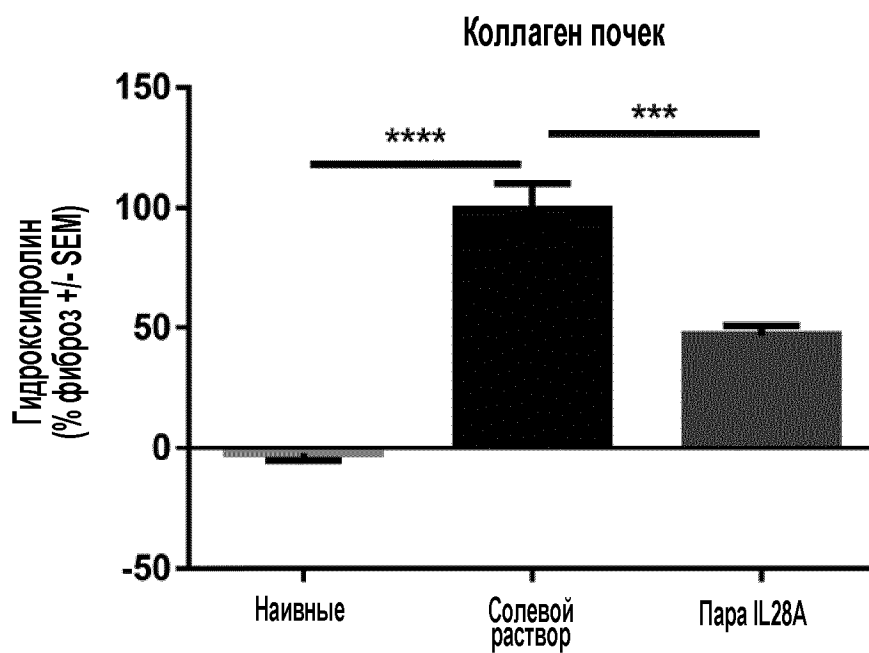
ФИГ. 1(b)



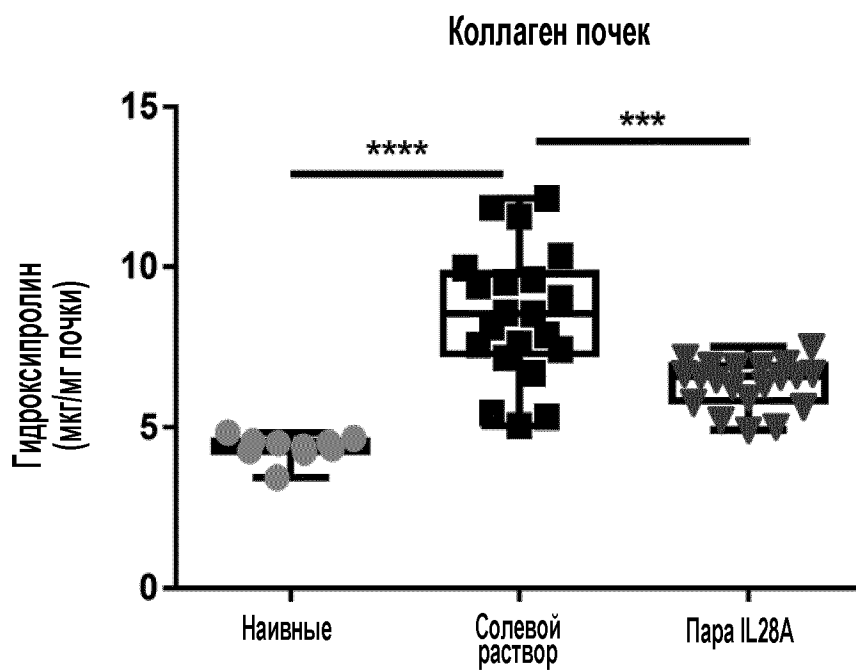
ФИГ. 1(c)

ФИГ. 2

Подтверждение IL-28A в качестве противofiброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином



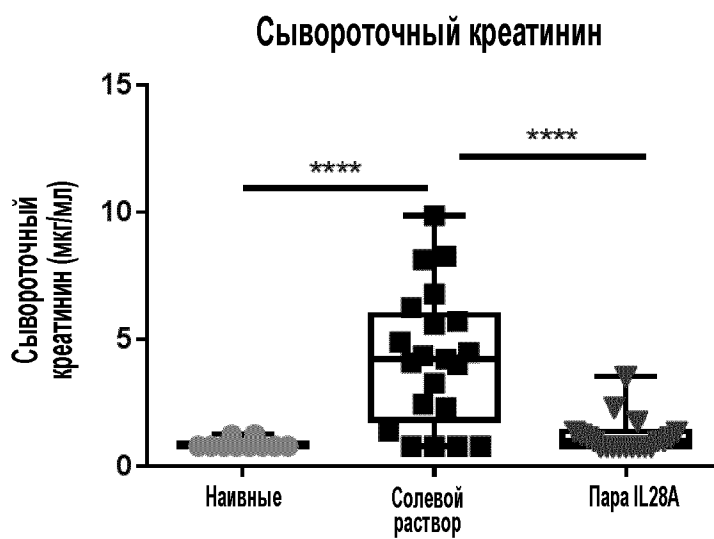
ФИГ. 2(a)



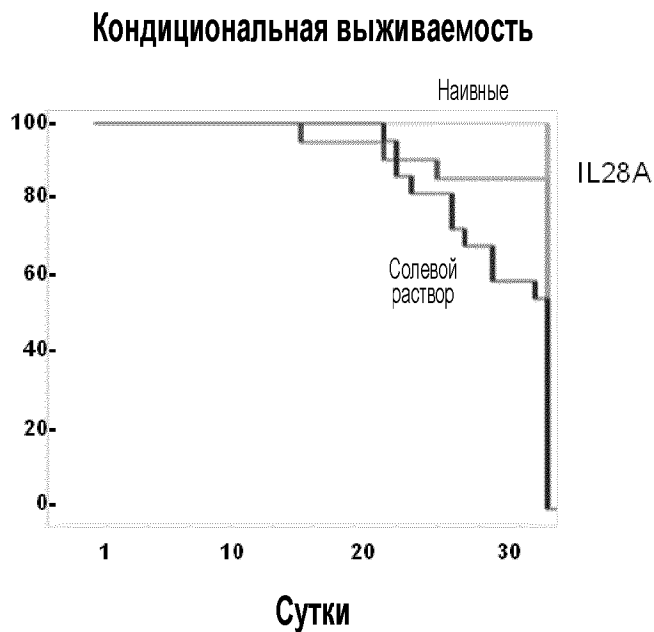
ФИГ. 2(b)

ФИГ. 2 (продолжение)

Подтверждение IL-28A в качестве противофиброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином



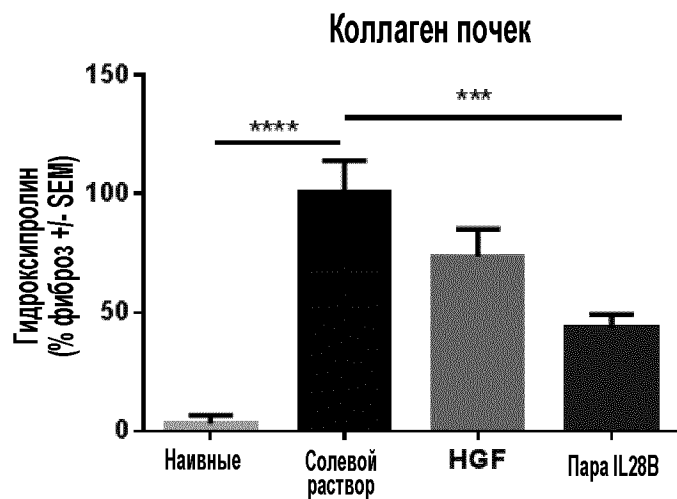
ФИГ. 2(с)



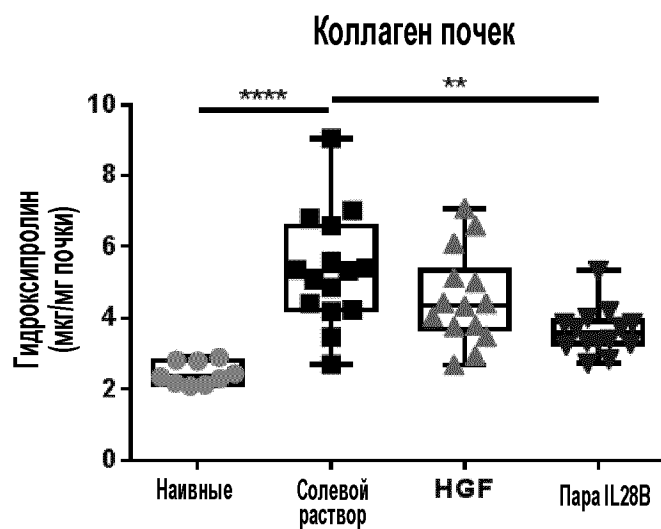
ФИГ. 2(d)

ФИГ. 3

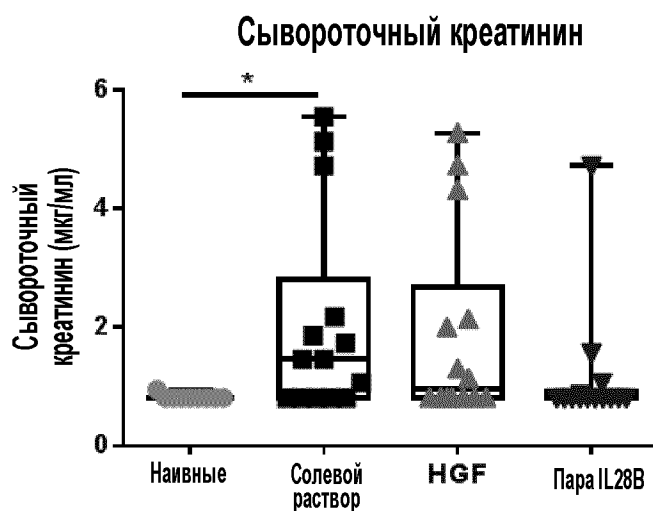
Идентификация IL-28B в качестве противofiброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином



ФИГ. 3(a)



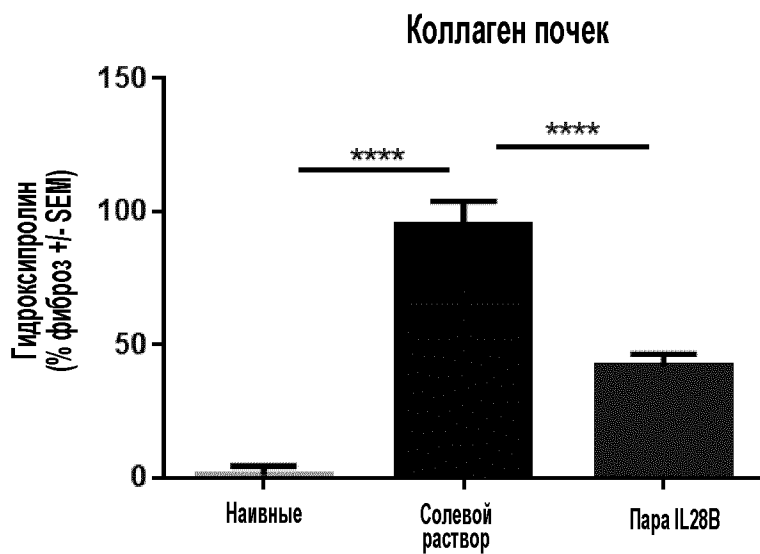
ФИГ. 3(b)



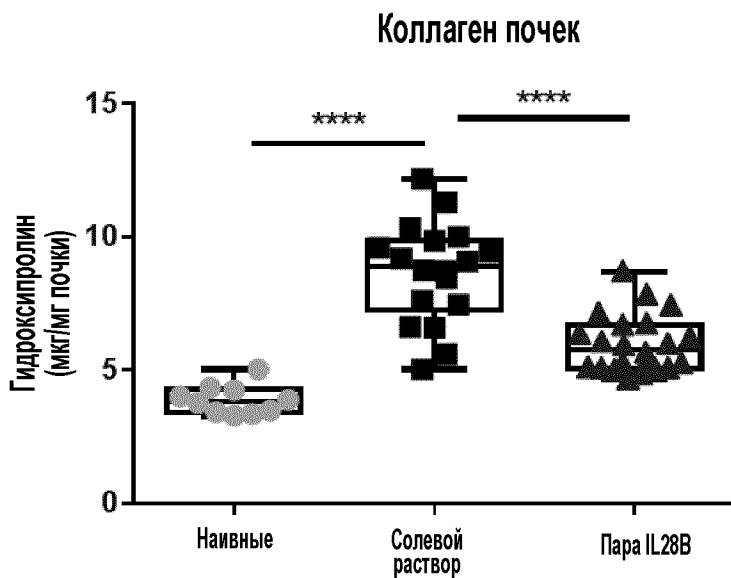
ФИГ. 3(c)

ФИГ. 4

Подтверждение IL-28B в качестве противofiброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином



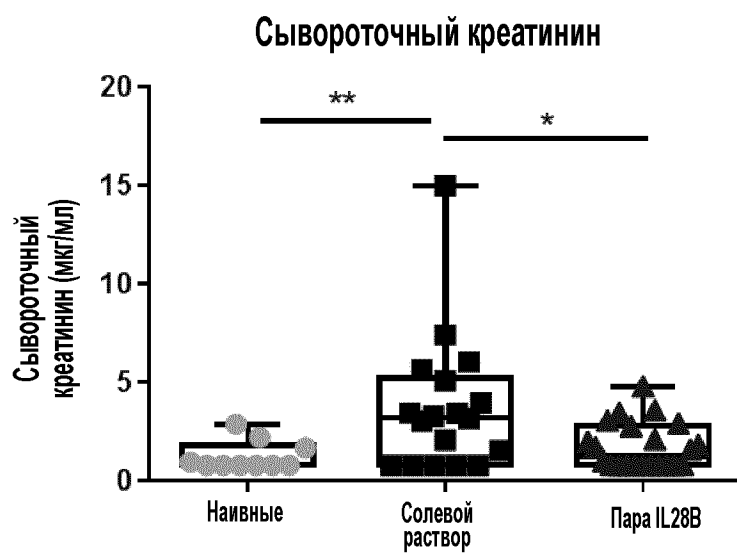
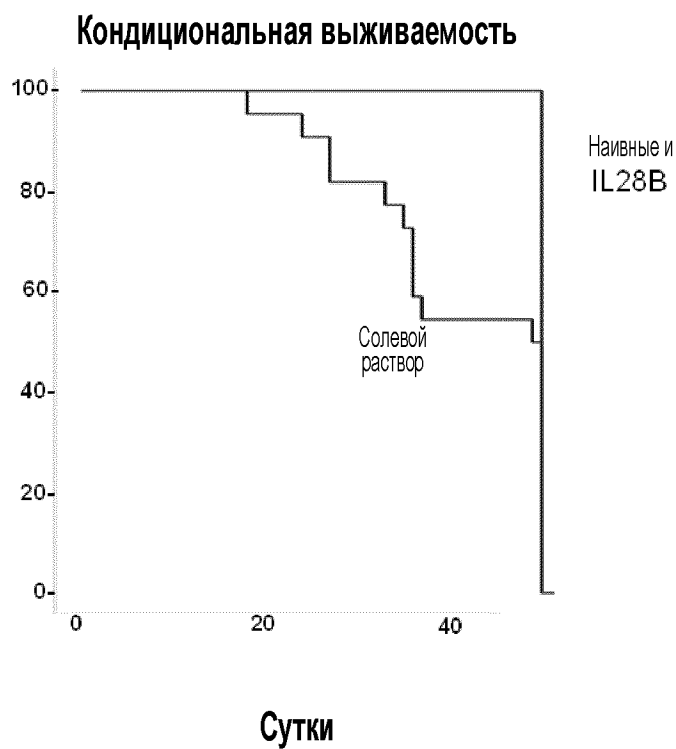
ФИГ. 4(a)



ФИГ. 4(b)

ФИГ. 4 (продолжение)

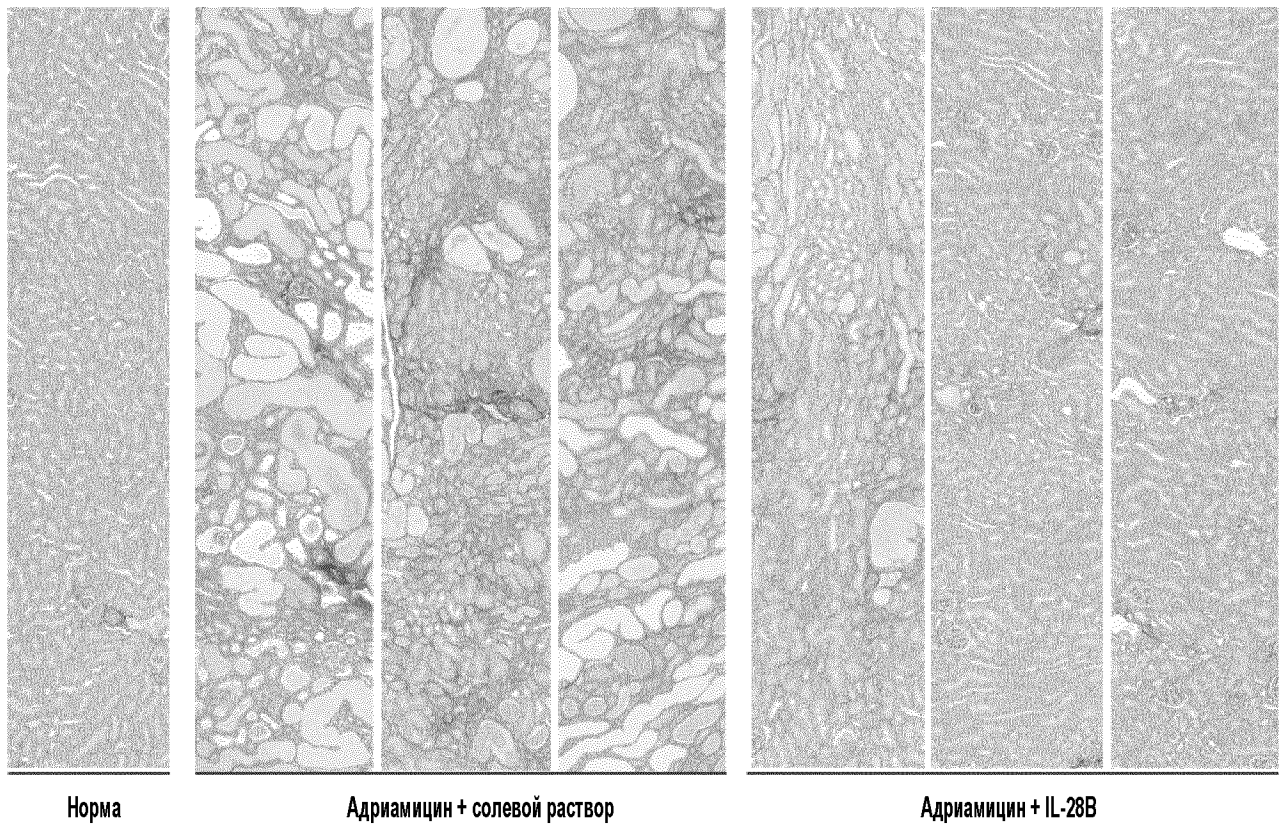
Подтверждение IL-28B в качестве противofiброзного средства в модели заболевания почек с адриамицином

**ФИГ. 4(с)****ФИГ. 4(d)**

ФИГ. 5

Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве
противофиброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

Фиг.5а: окрашивание PSR посредством почки после введения IL-28B - Модель
заболевания почек с адриамицином

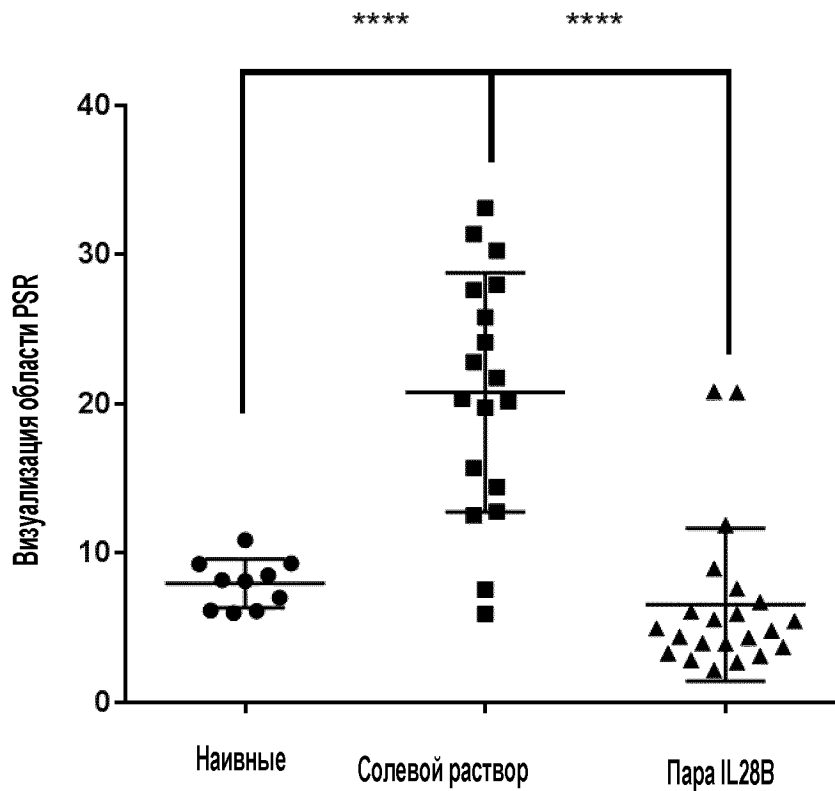


ФИГ. 5(а)

ФИГ. 5 (продолжение)

Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве
противофиброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

Количественное определение окрашивания посредством PSR с помощью
многопараметрического окрашивания



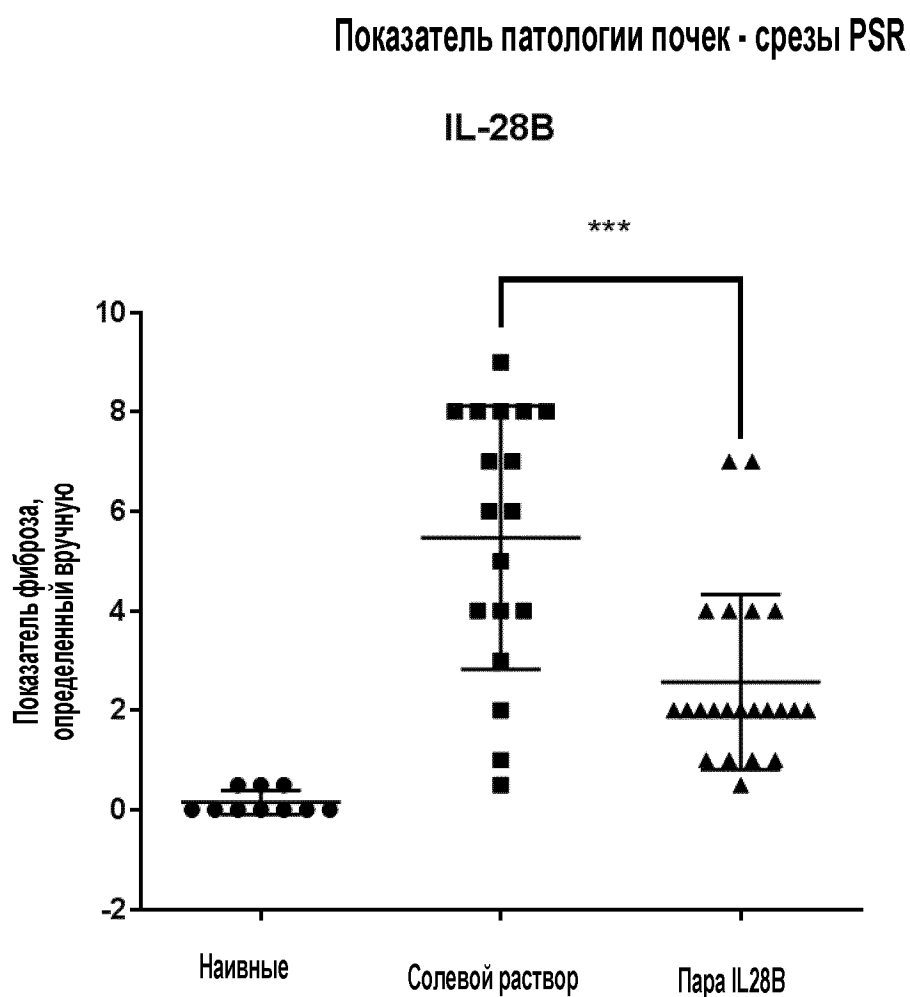
ФИГ. 5(b)

Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве
противофиброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

ФИГ. 5(d)

ФИГ. 5 (продолжение)

Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве
противофиброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

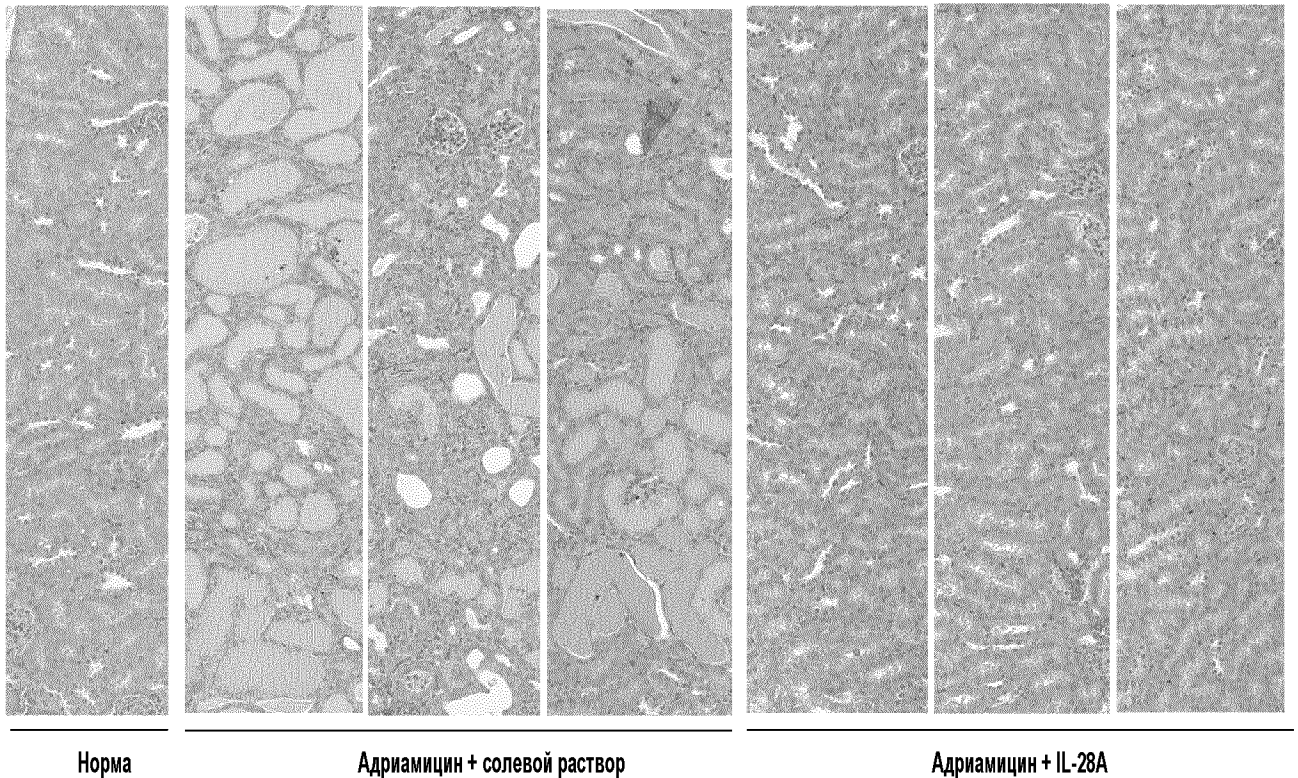


ФИГ. 5(e)

ФИГ. 5 (продолжение)

Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве
противофиброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

Фиг.5f: окрашивание PSR посредством почки после введения IL-28A - Модель
заболевания почек с адриамицином

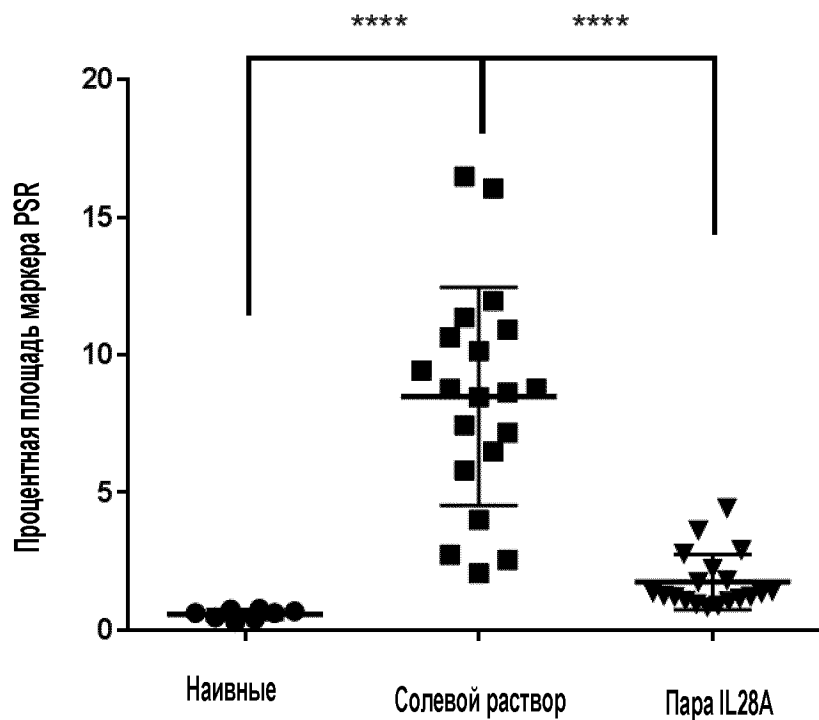


ФИГ. 5(f)

ФИГ. 5 (продолжение)

Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве
противофиброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

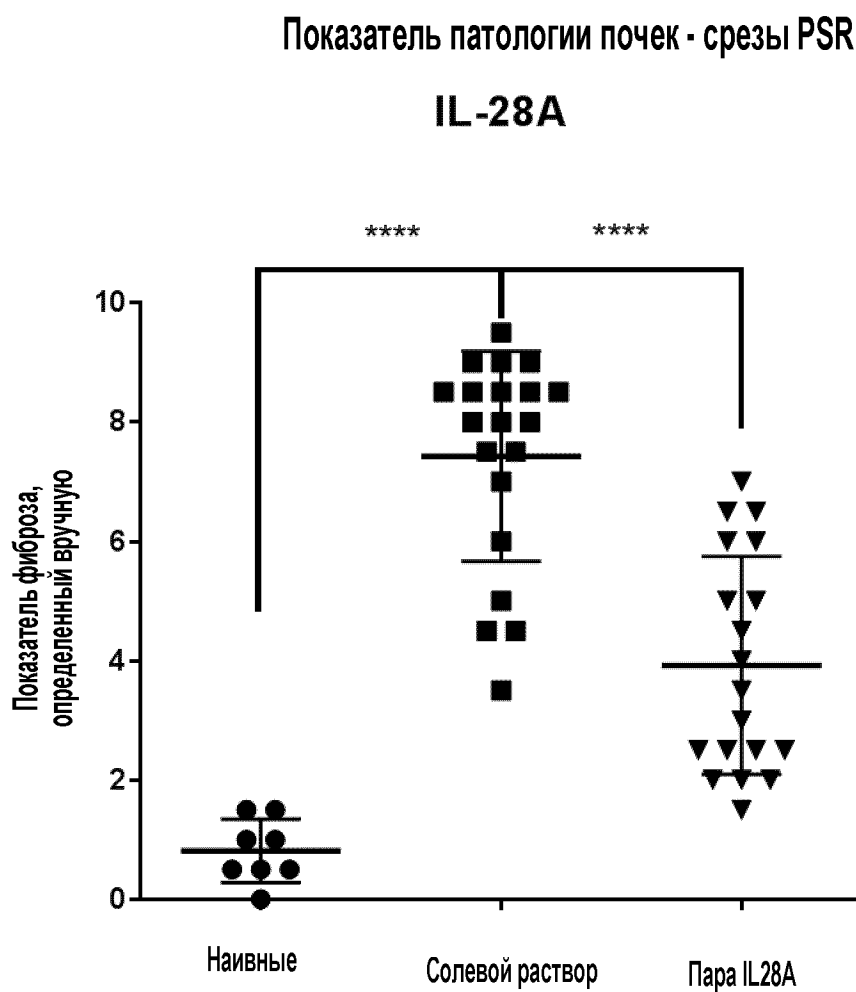
Количественное определение окрашивания посредством PSR с помощью
многопараметрического окрашивания
IL-28A



ФИГ. 5(g)

ФИГ. 5 (продолжение)

Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве
противофиброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

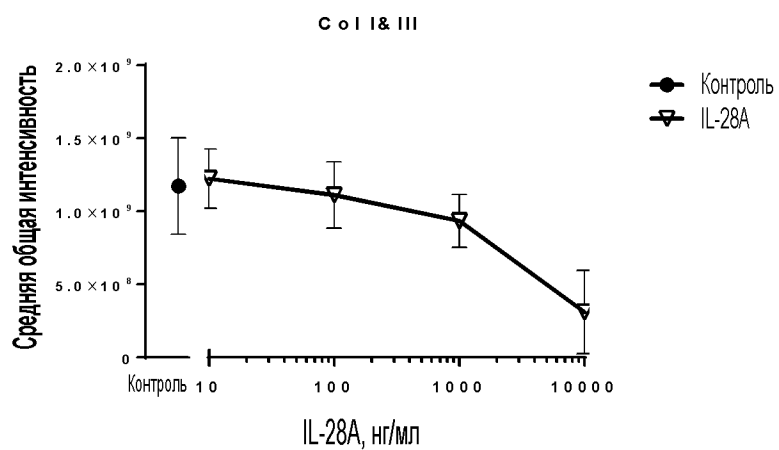
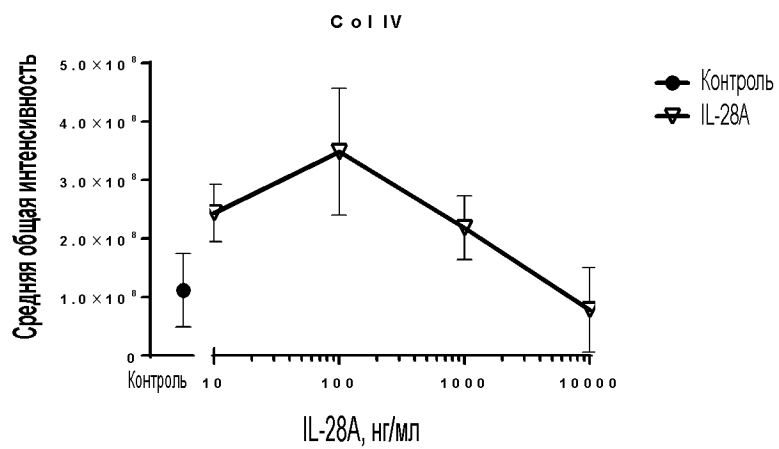
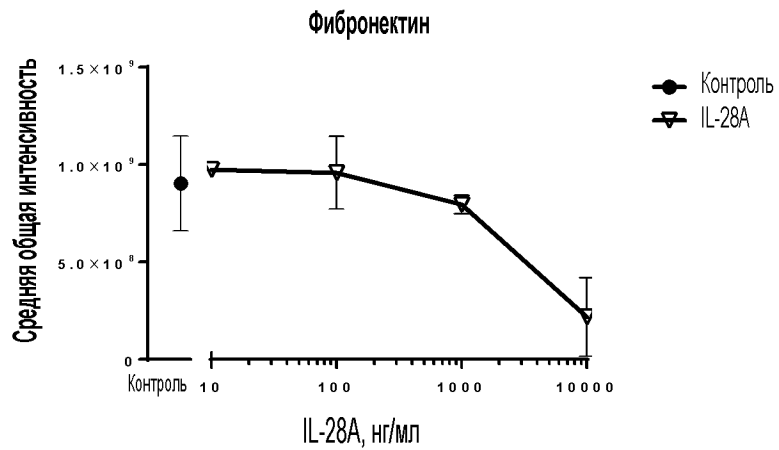


ФИГ. 5(h)

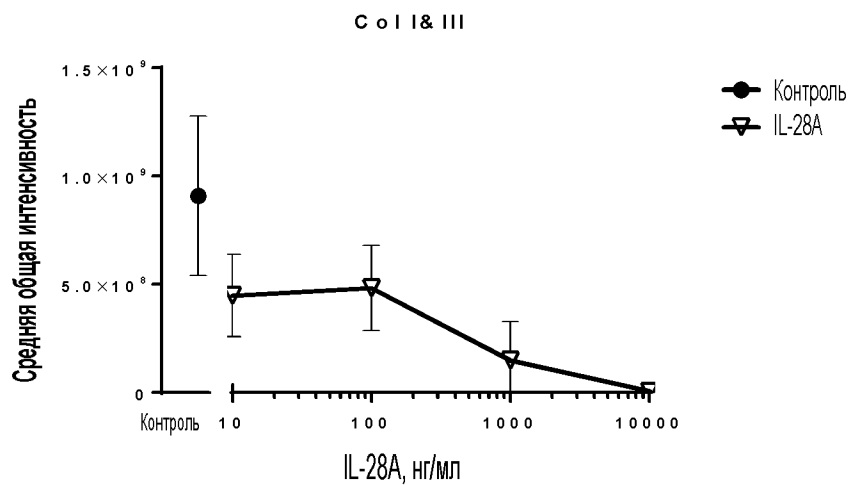
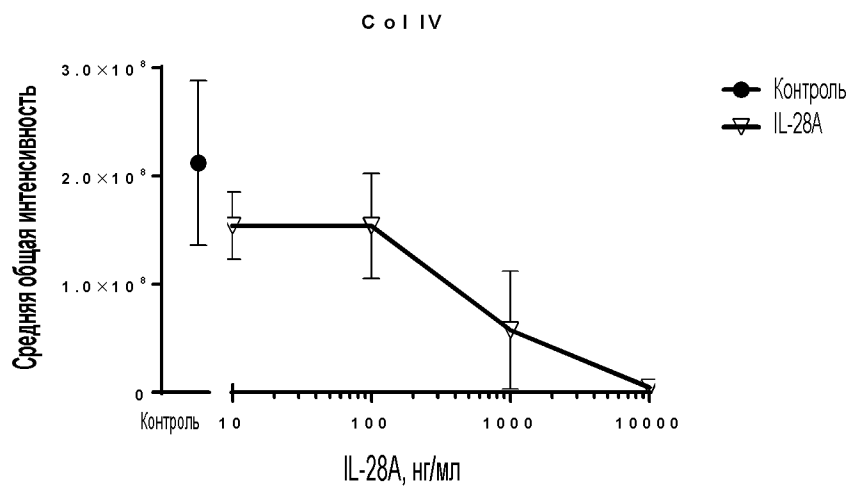
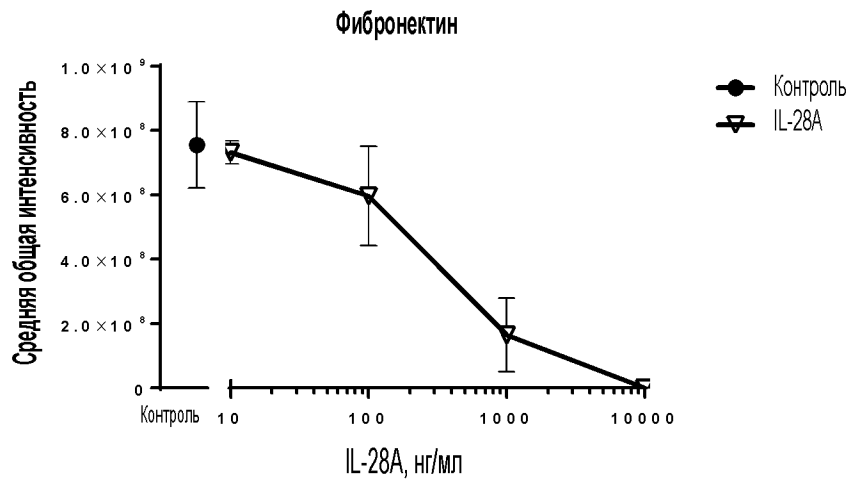
Гистологическое подтверждение IL-28B и IL-28A в качестве
противофиброзных средств в модели заболевания почек с адриамицином

ФИГ. 6 (а)

Эффект IL-28A в модели фиброза *in vitro*
на ЕСМ звездчатых клетках печени

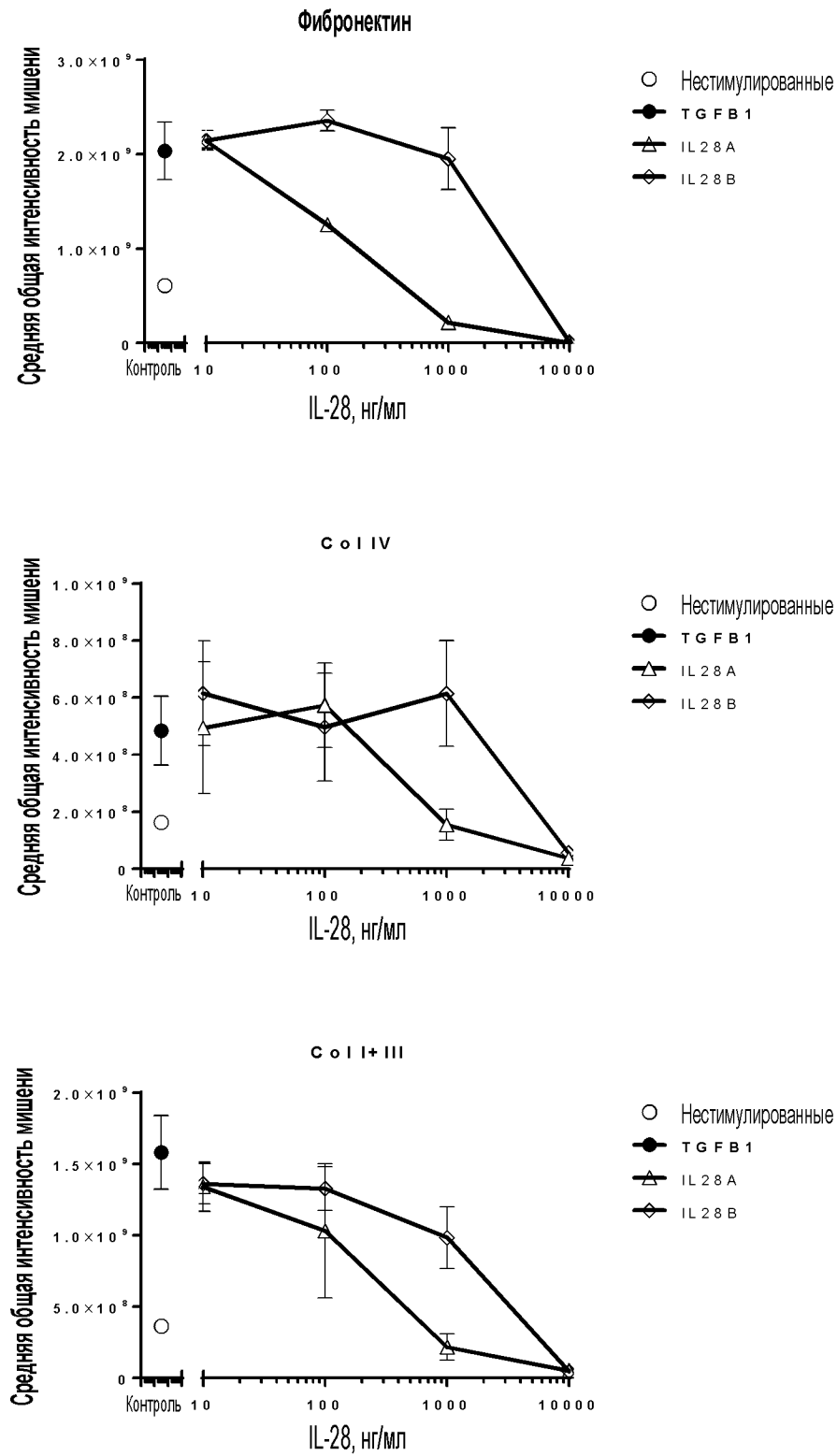


ФИГ. 6 (b)

Эффект IL-28A в модели фиброза *in vitro* на ЕСМ звездчатых клетках
печени-гепатоцитах

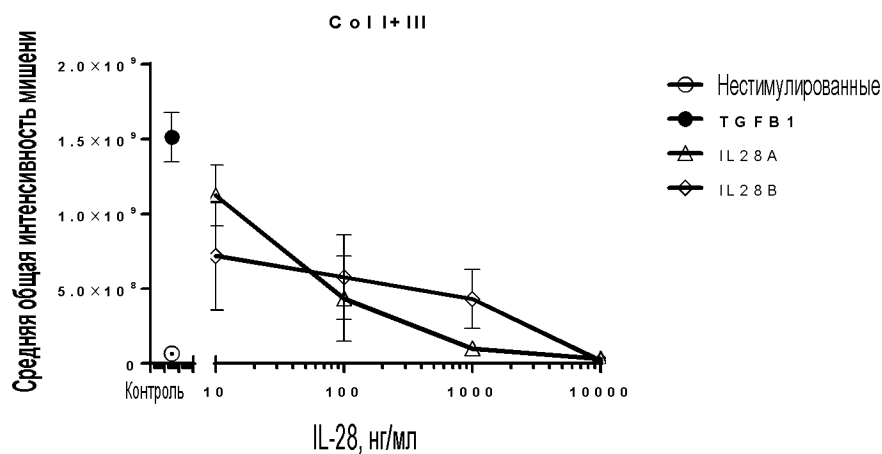
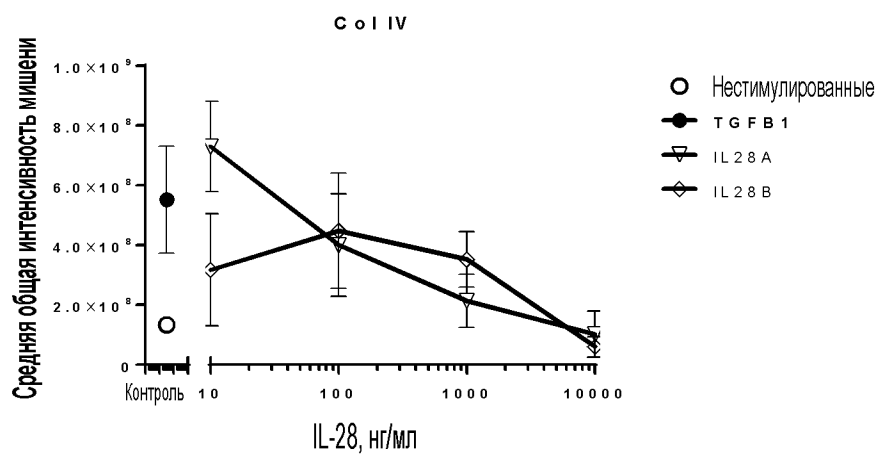
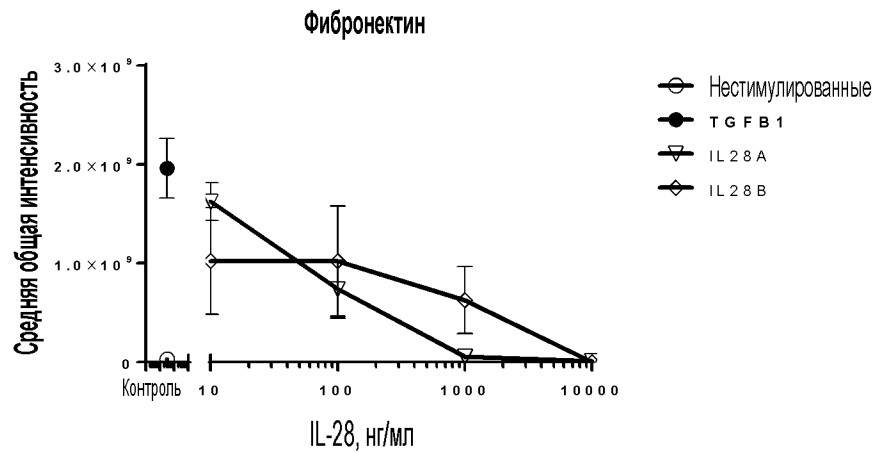
ФИГ.7 (а)

Эффект IL-28A и IL-28B в модели фиброза *in vitro* на ECM звездчатых клетках печени плюс TGF β



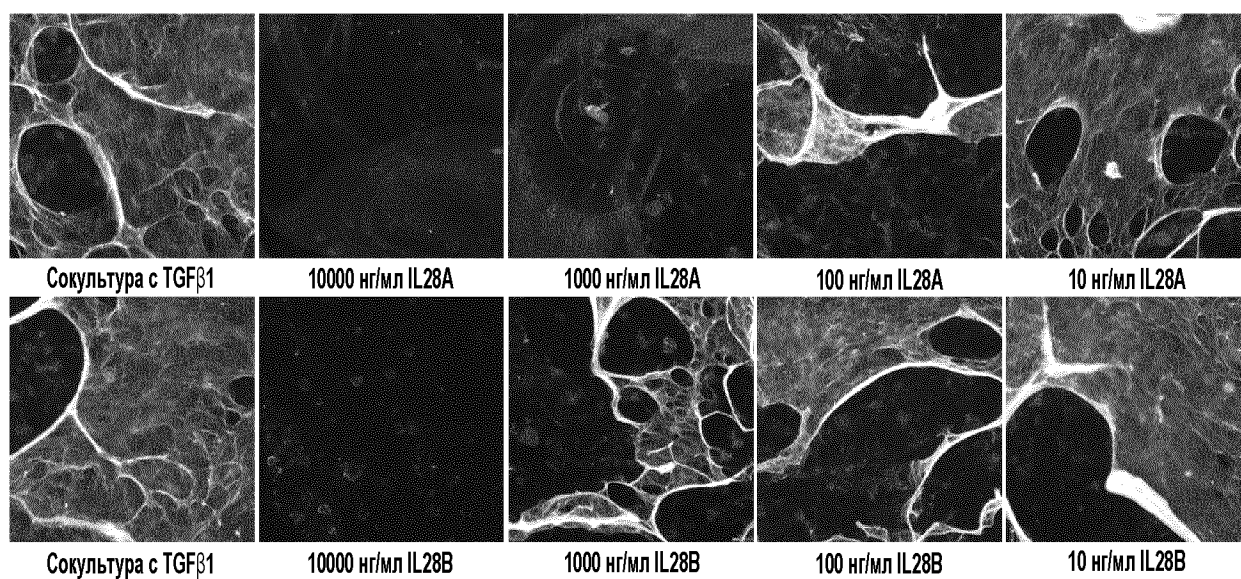
ФИГ. 7 (b)

Эффект IL-28A и IL-28B в модели фиброза *in vitro* на ECM сокультуры звездчатых клеток и гепатоцитов печени плюс TGF β



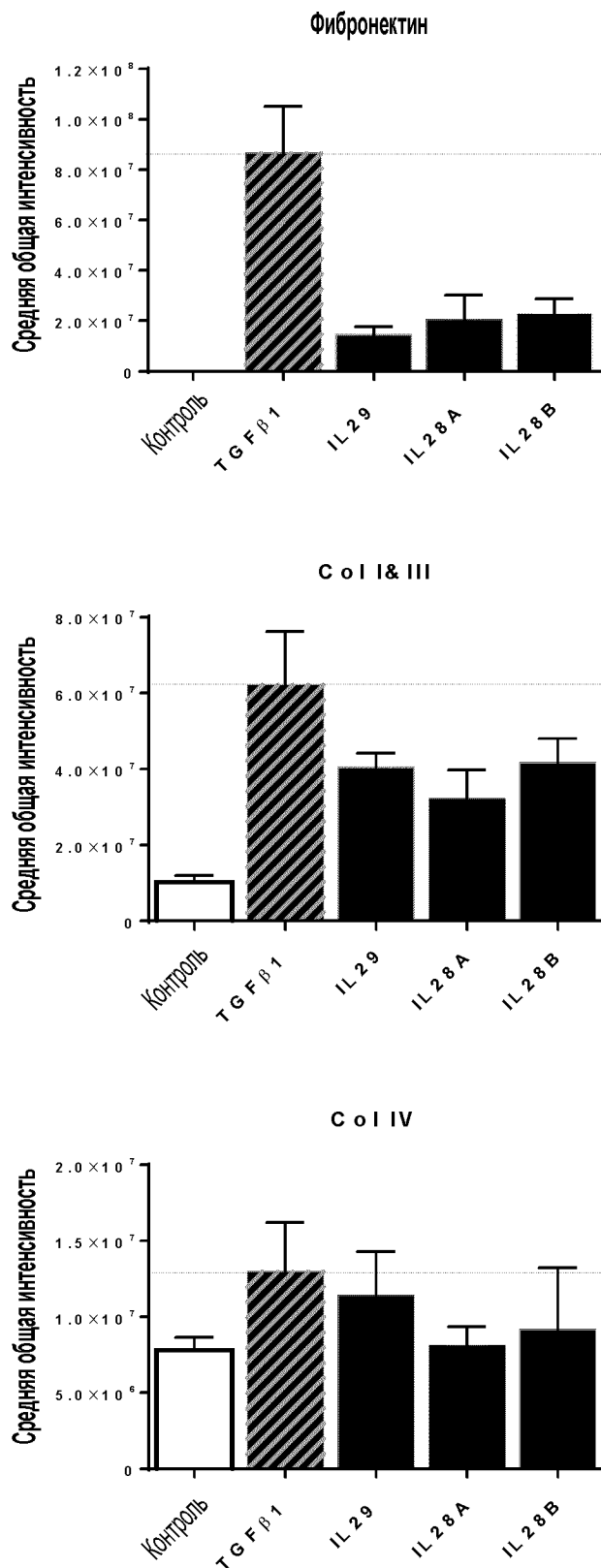
ФИГ. 8

Многопараметрические изображения, демонстрирующие эффект IL-28A и IL-28B в ЕСМ стимулированной TGF β 1 сокультуры звездчатых клеток и гепатоцитов



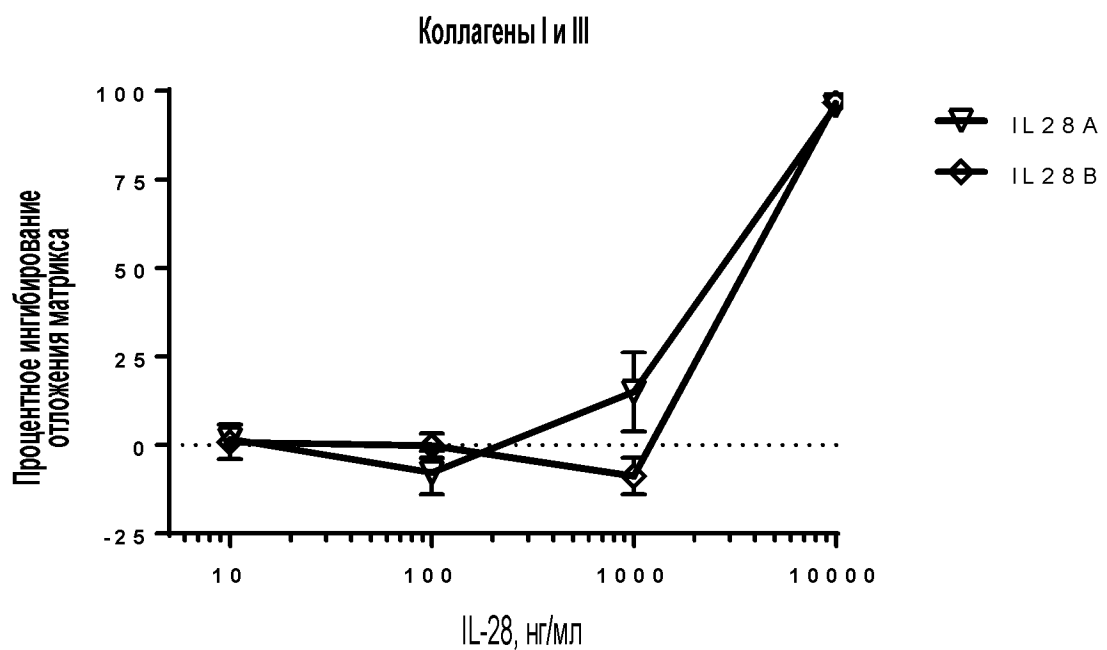
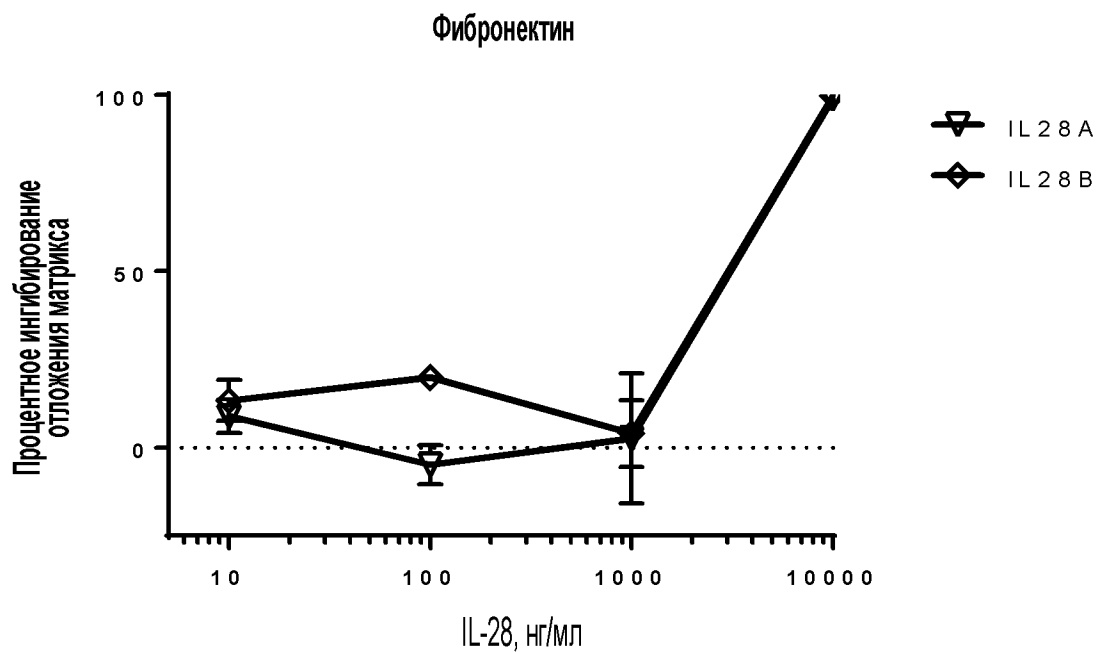
ФИГ. 9

Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ TGF β 1-стимулированных фибробластов тонкого кишечника

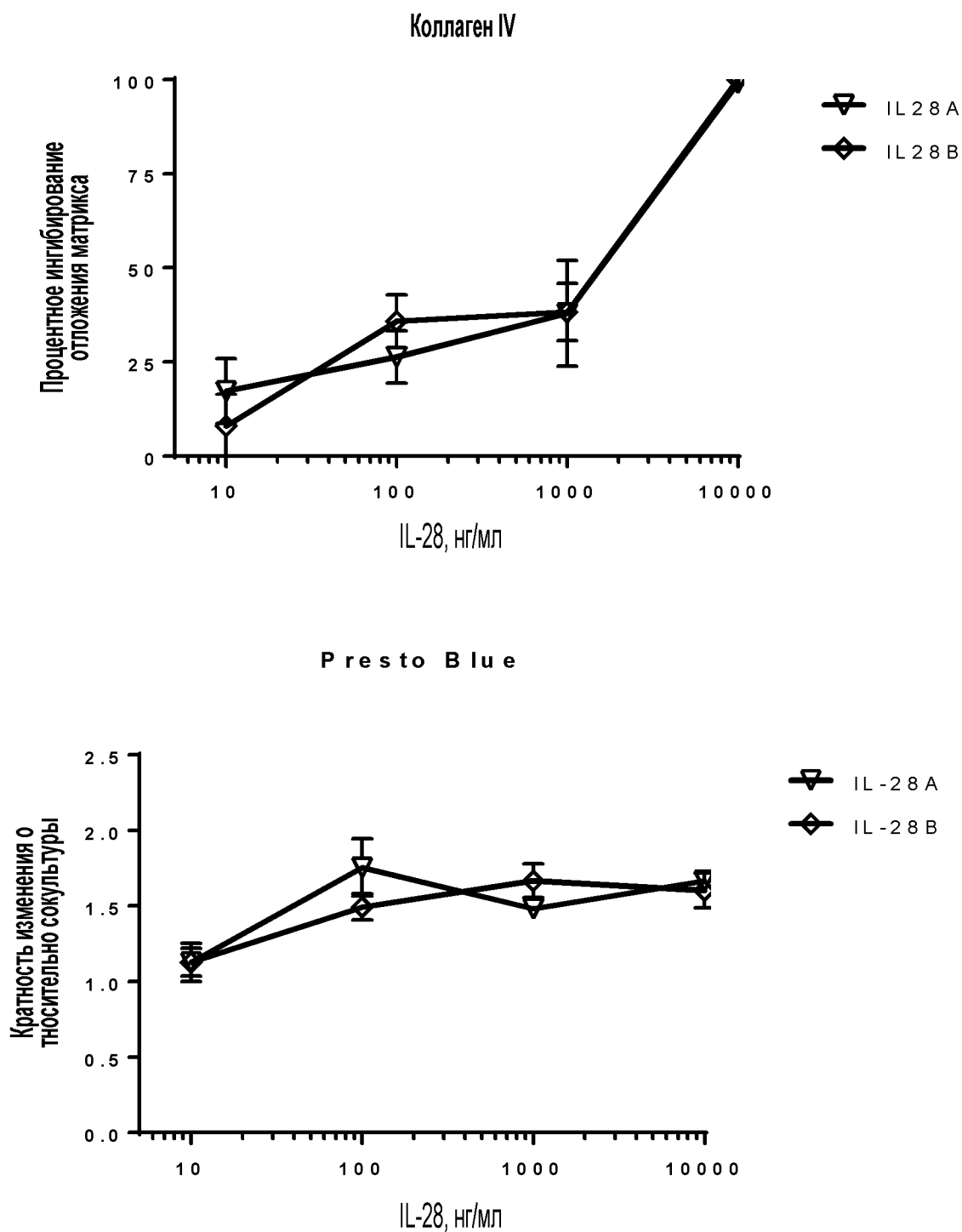


ФИГ. 10

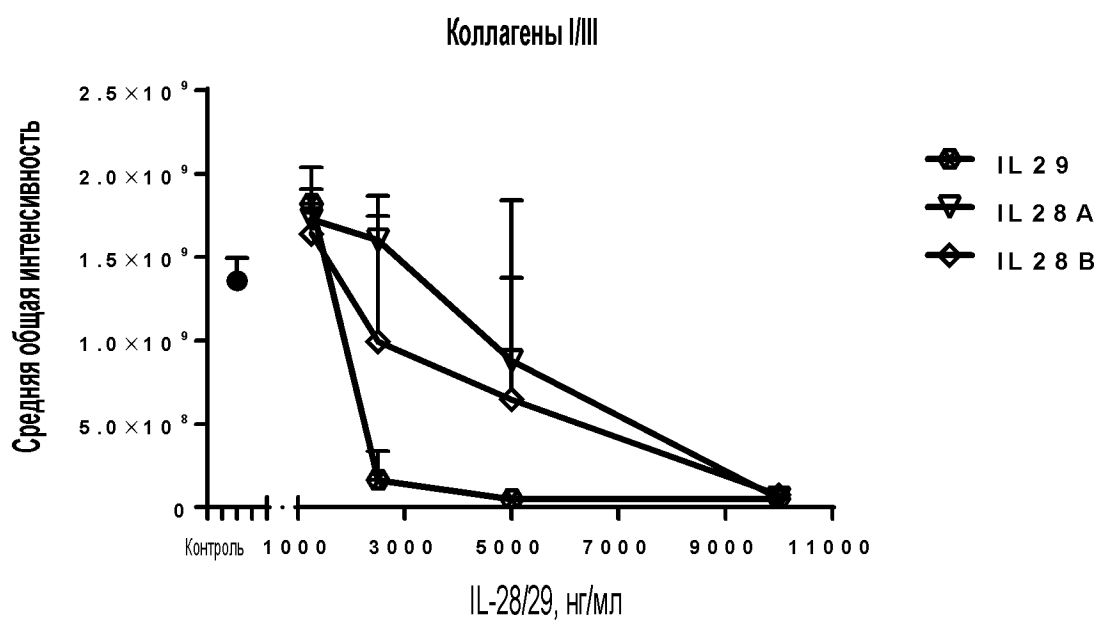
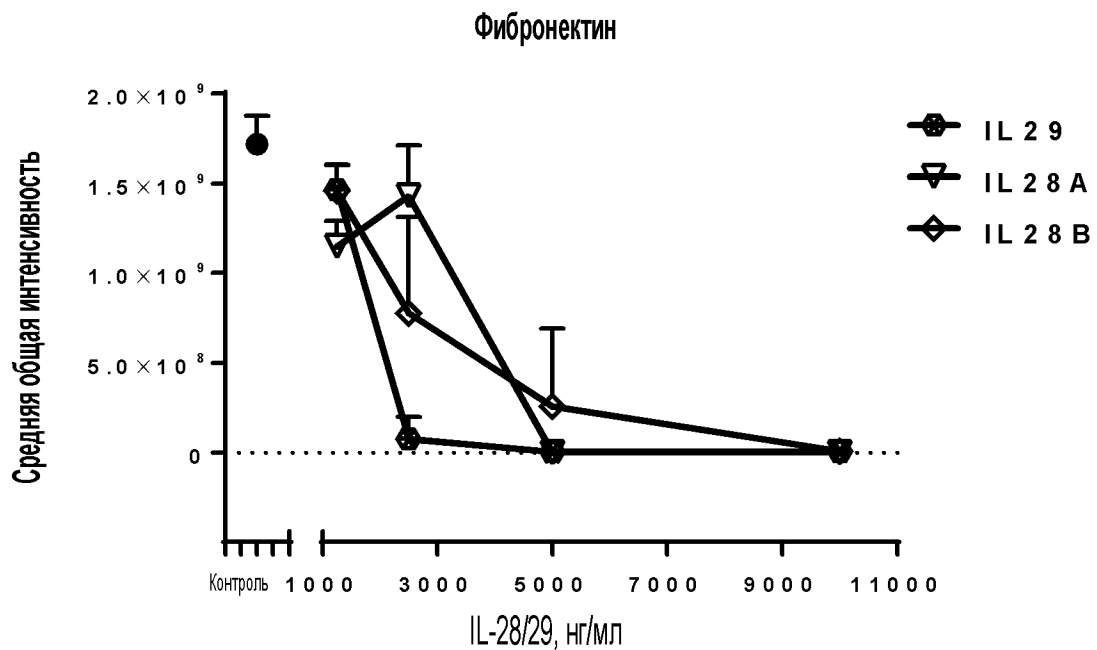
% Ингибирование IL-28A и IL-28B в ЕСМ сокультуры кератиноцитов кожи и фибробластов



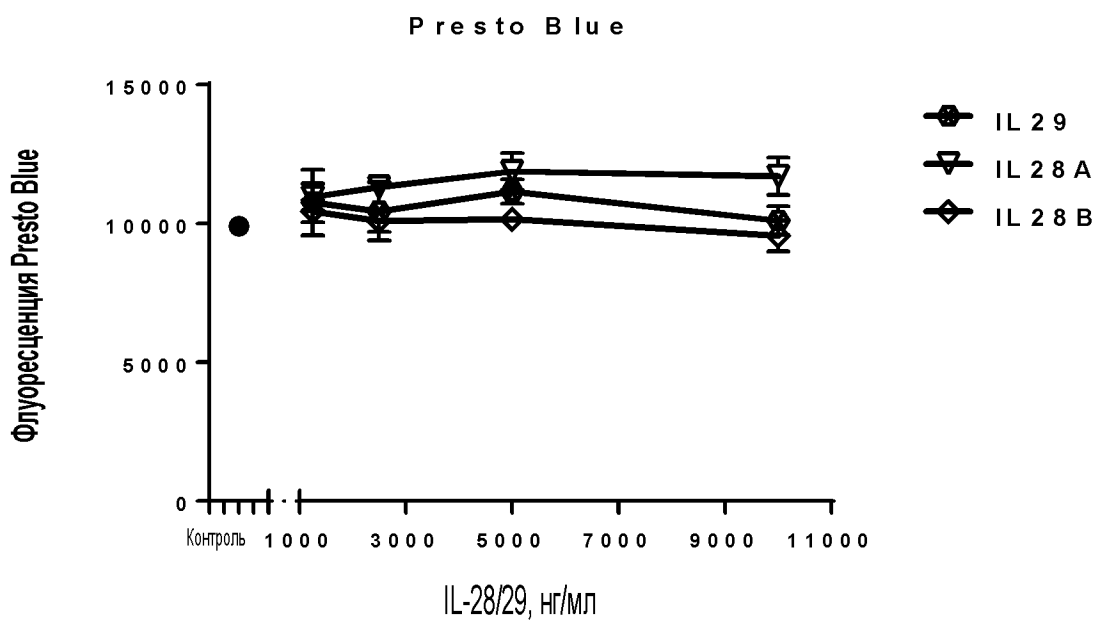
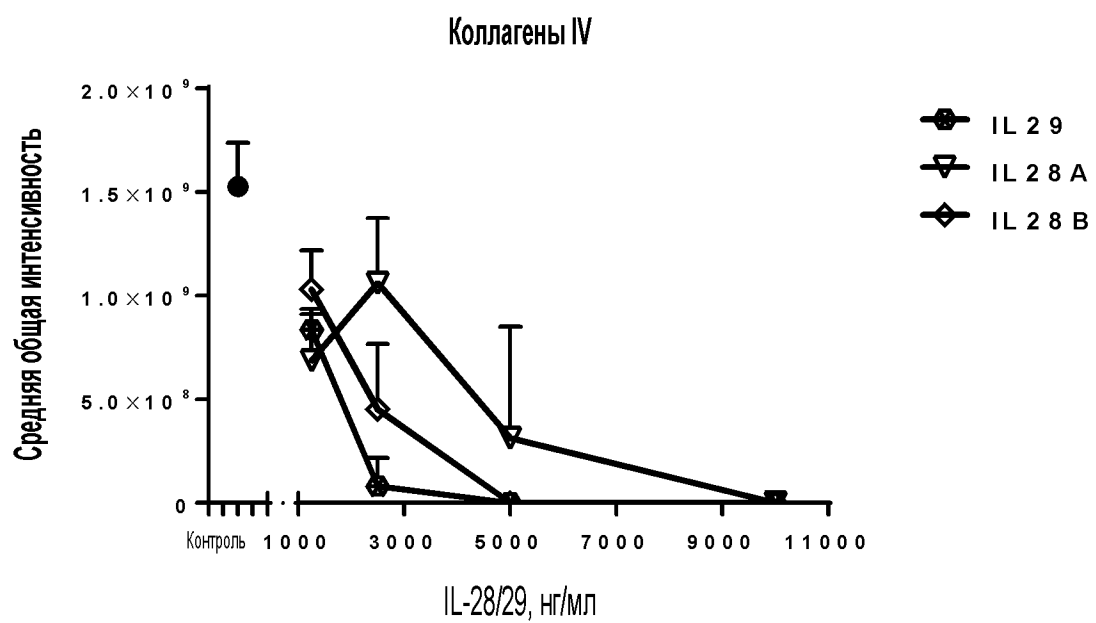
ФИГ. 10 (продолжение)

% Ингибирование IL-28A и IL-28B в ЕСМ сокультуры кератиноцитов кожи и фибробластов

ФИГ. 11

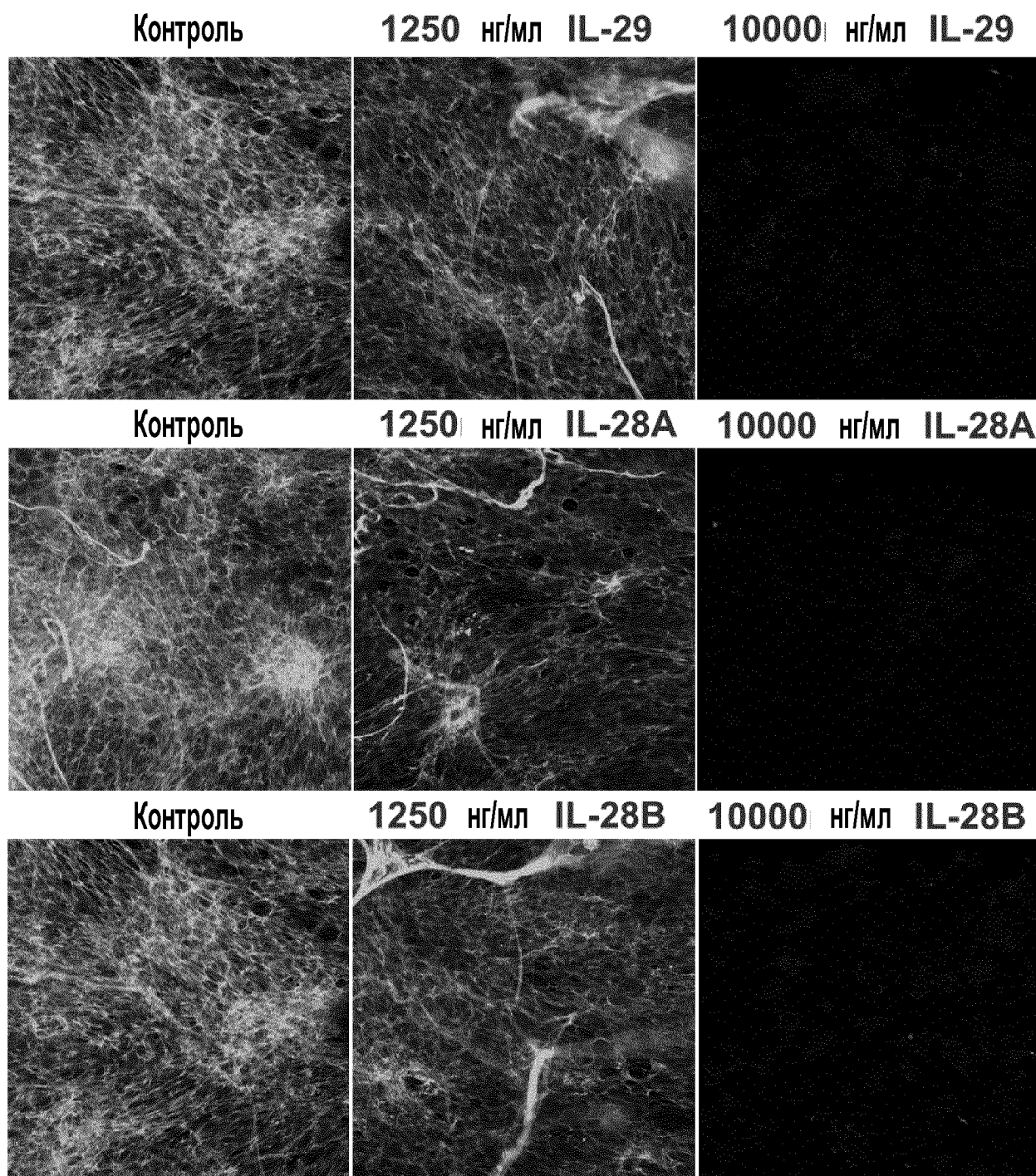
Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 на ЕСМ сокультуры кератиноцитов кожи и фибробластов

ФИГ. 11 (продолжение)

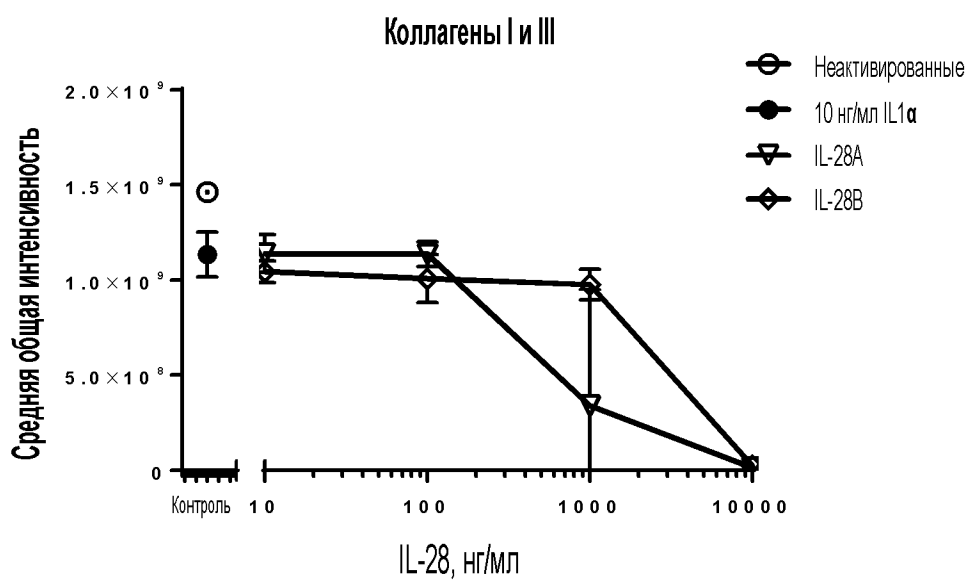
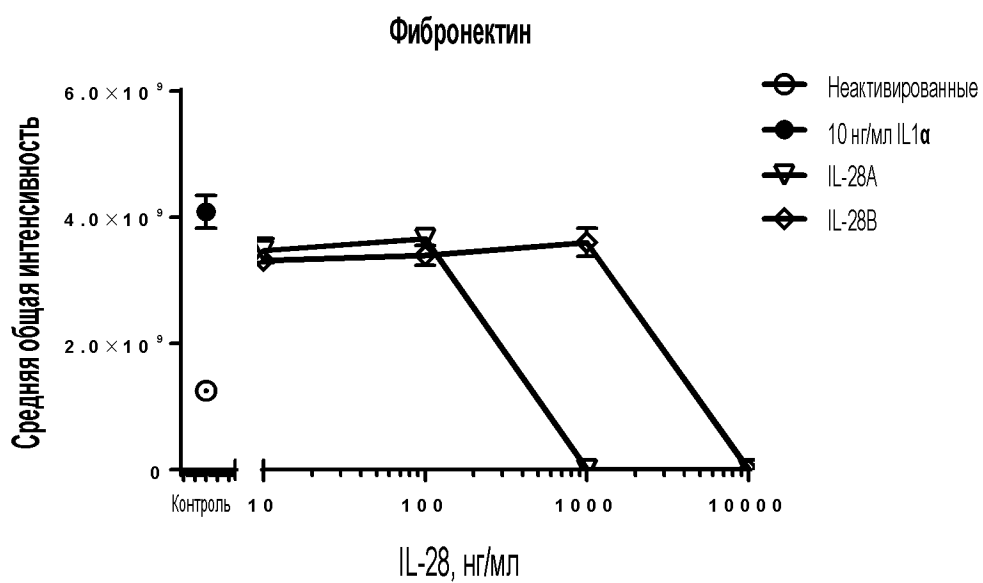
Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 на ЕСМ сокультуры кератиноцитов кожи
и фибробластов

ФИГ. 12

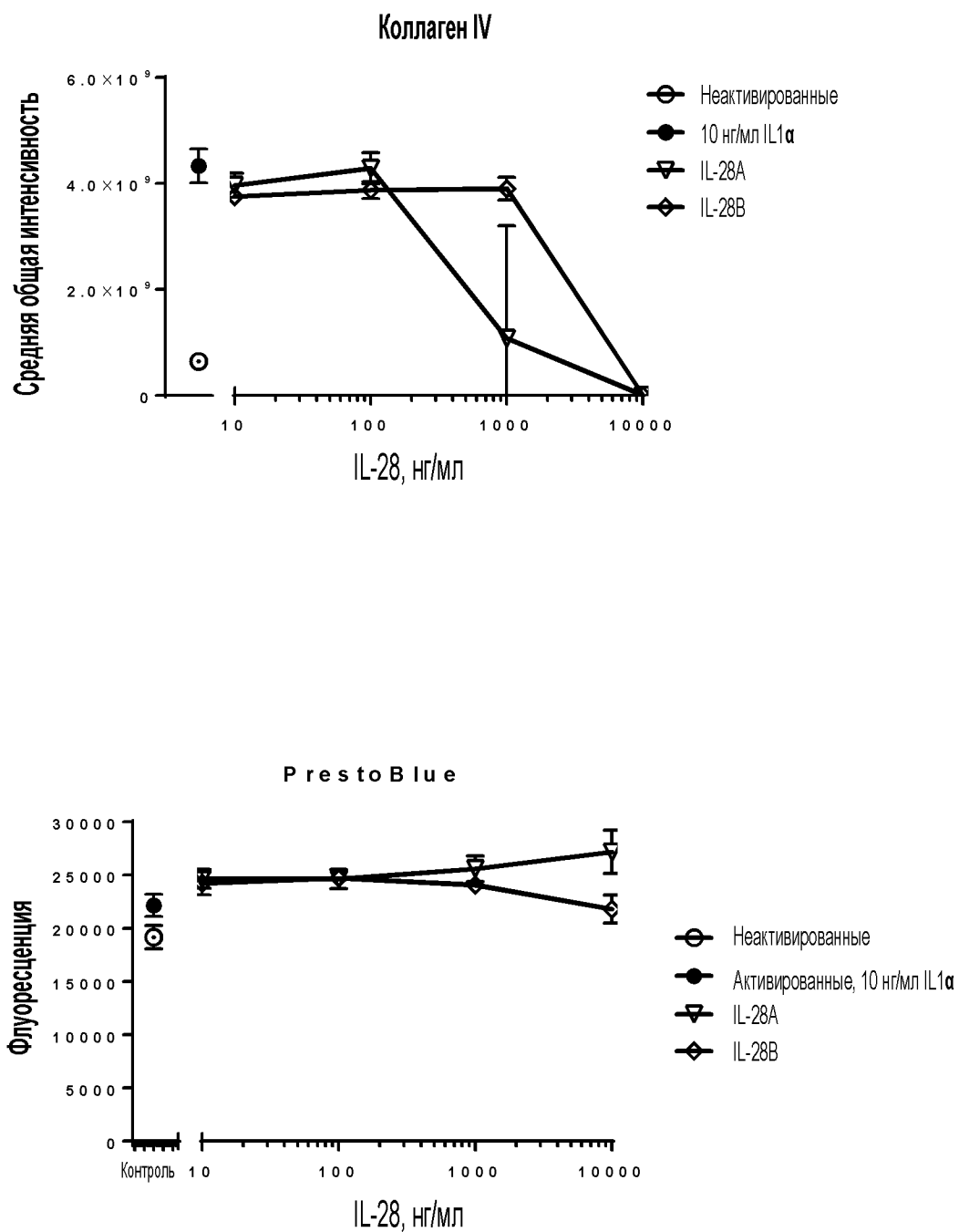
Многопараметрические изображения, демонстрирующие эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ сокультуры кератиноцитов кожи и фибробластов



ФИГ. 13

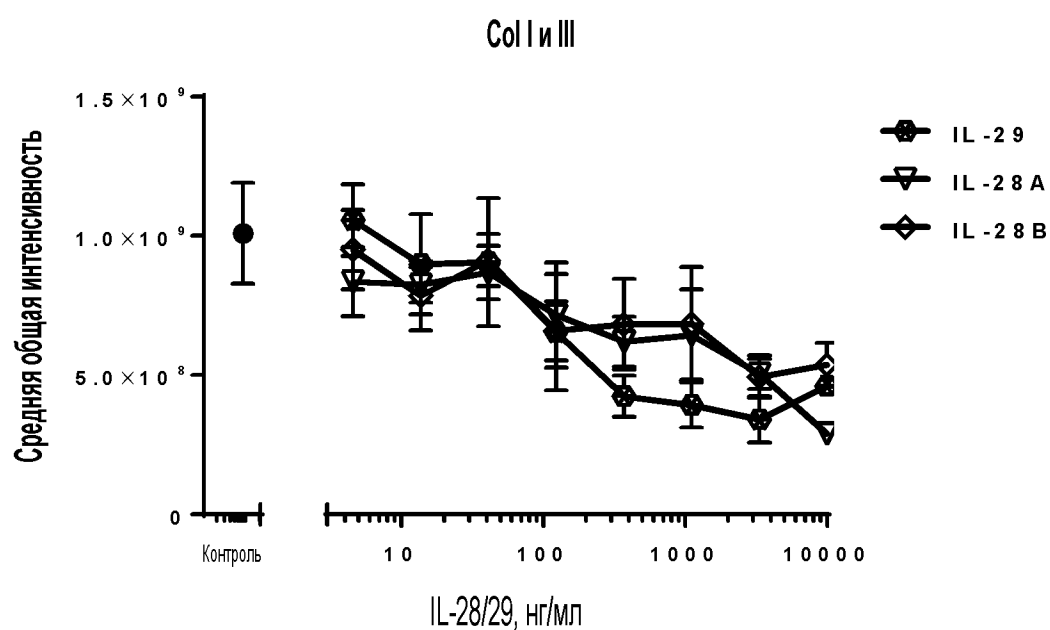
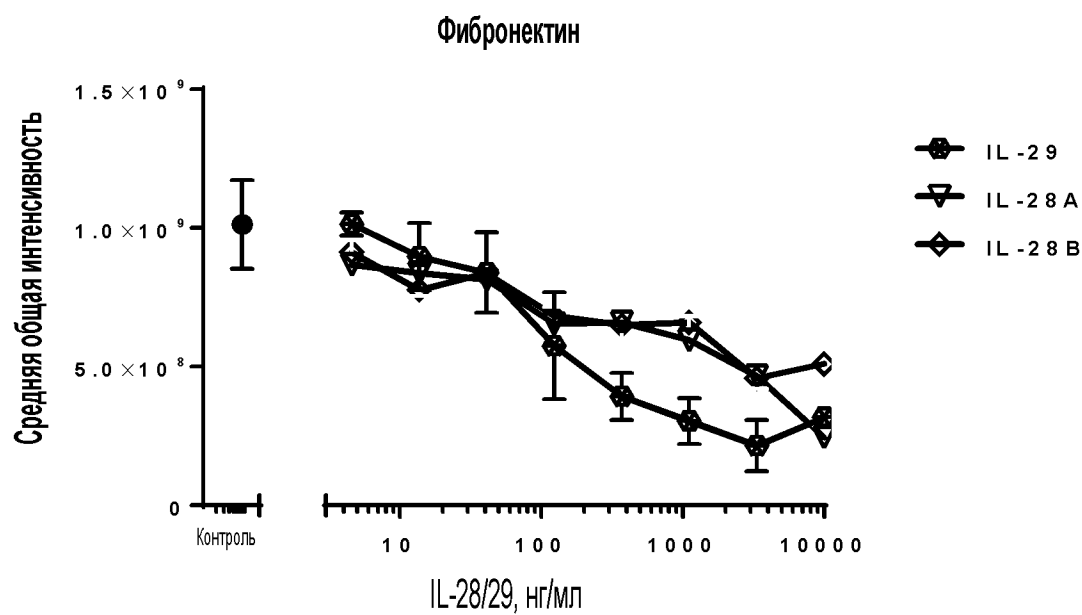
Эффект IL-28A и IL-28B в ЕСМ стимулированных IL-1 α фибробластов кожи

ФИГ. 13 (продолжение)

Эффект IL-28A и IL-28B в ЕСМ стимулированных IL-1 α фибробластов кожи

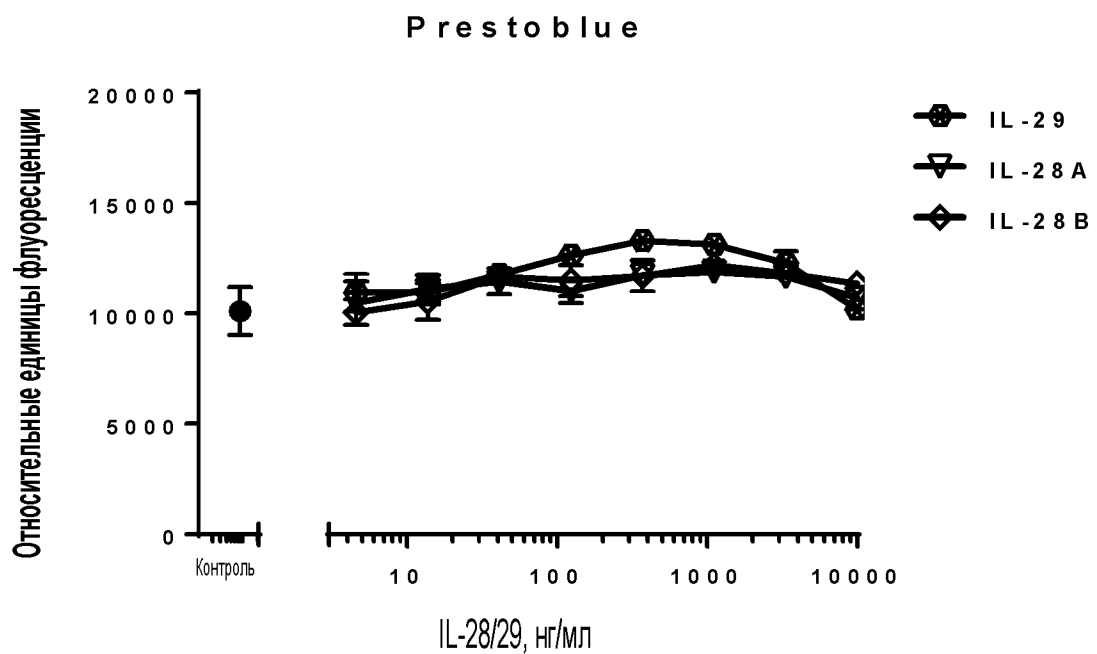
ФИГ. 14(а)

Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ сокультуры RPTEC почки-фибробласты
и жизнеспособность клеток - добавление к сокультуре



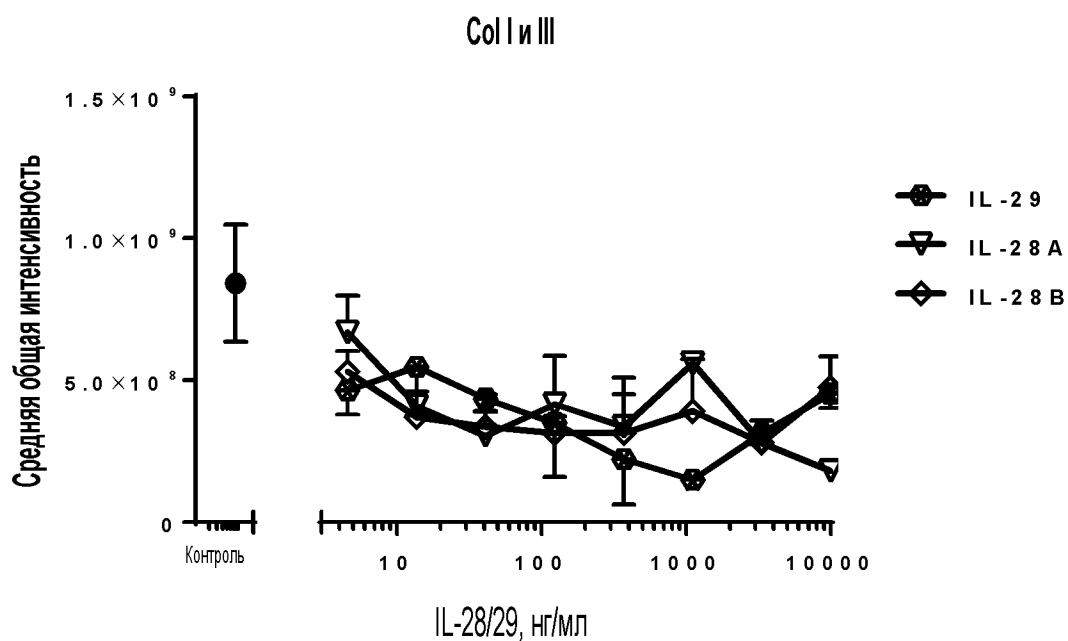
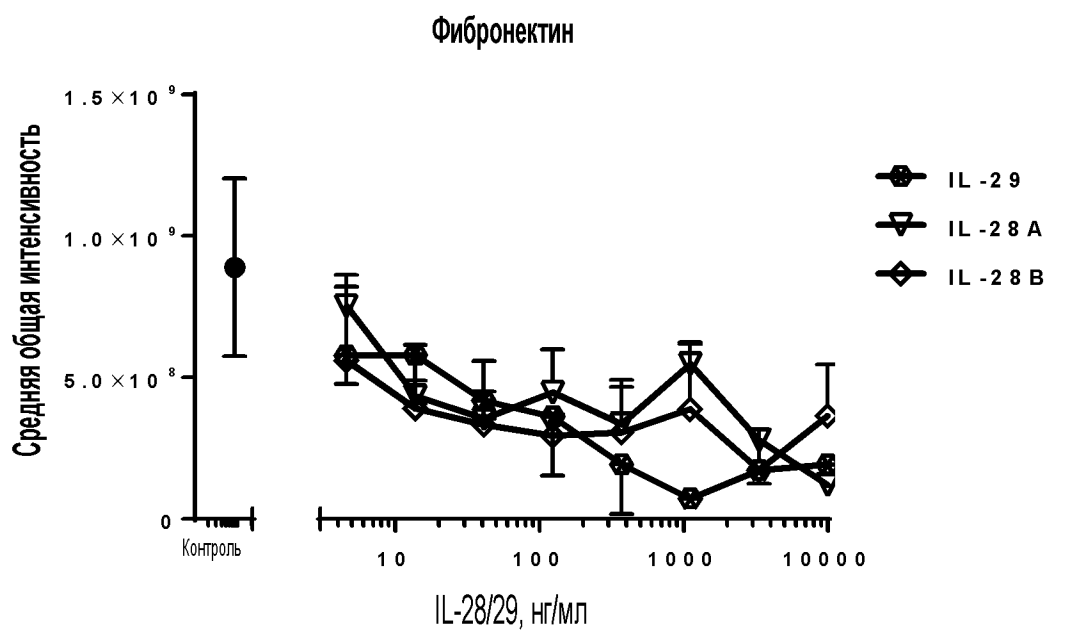
ФИГ. 14(а) (продолжение)

Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ сокультуры RPTEC почки-фибробласты
и жизнеспособность клеток - добавление сначала RPTEC



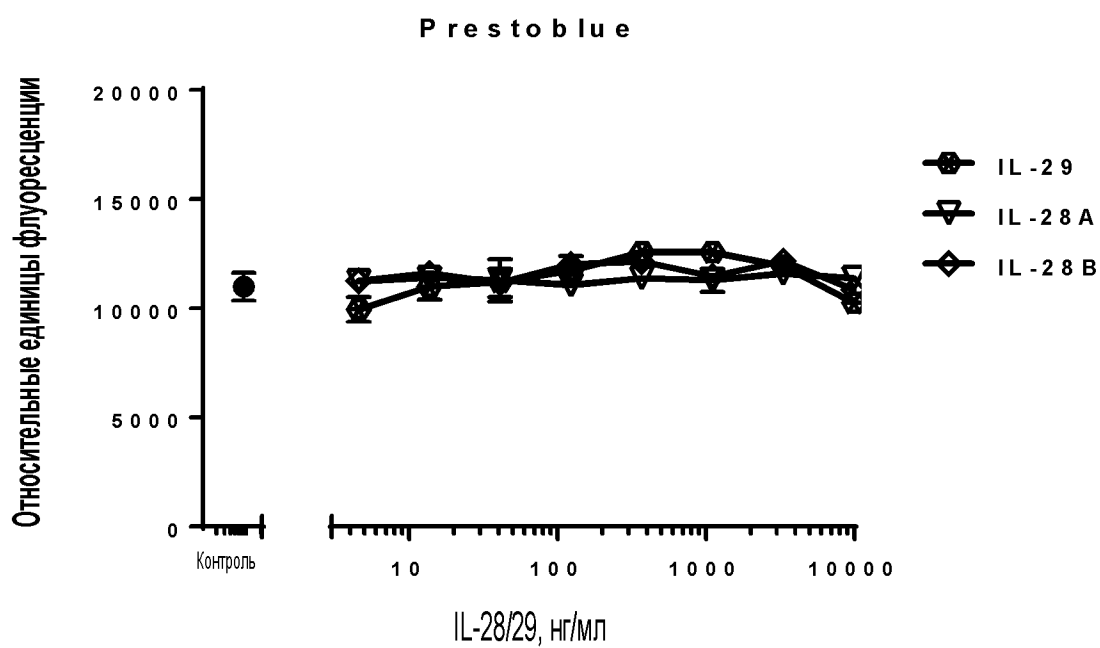
ФИГ. 14(b)

Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ сокультуры RPTEC почки-фибробласты
и жизнеспособность клеток - добавление сначала RPTEC



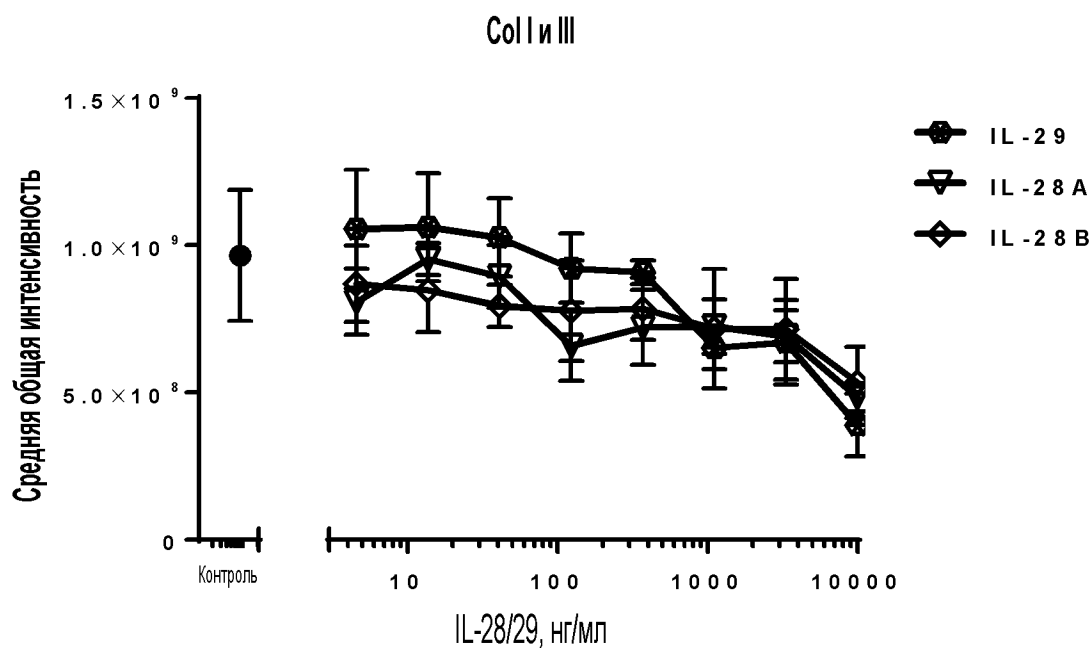
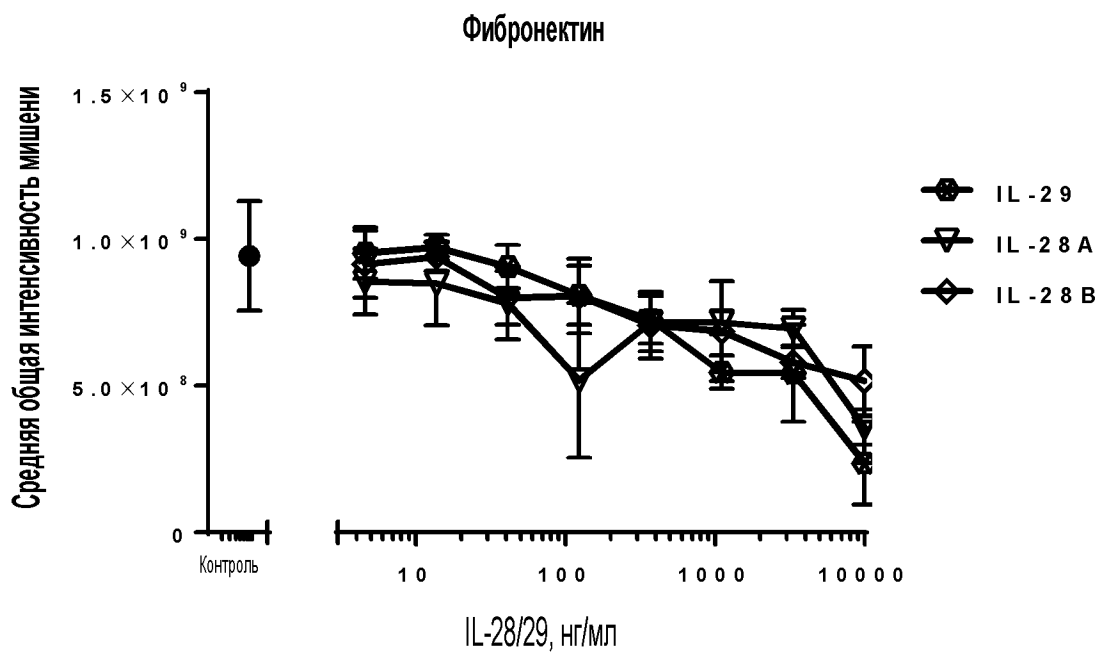
ФИГ. 14(b) (продолжение)

Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ сокультуры RPTEC почки-фибробласты
и жизнеспособность клеток - добавление сначала RPTEC



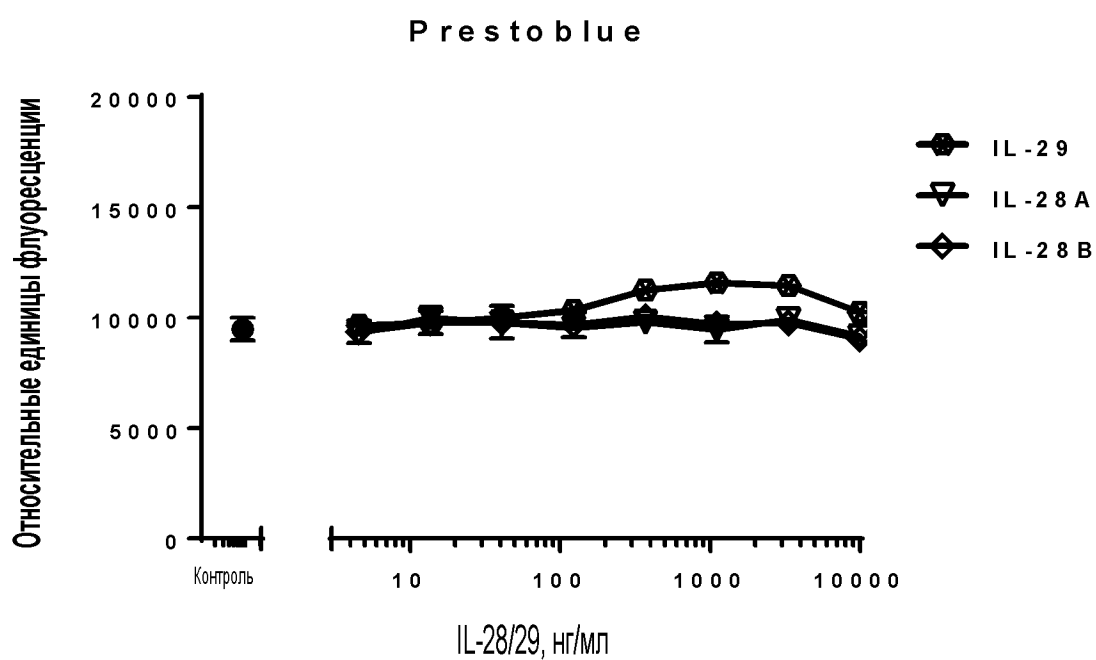
ФИГ. 14(с)

Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ сокультуры RPTEC почки-фибробласты и жизнеспособность клеток - добавление сначала - добавление сначала HRF



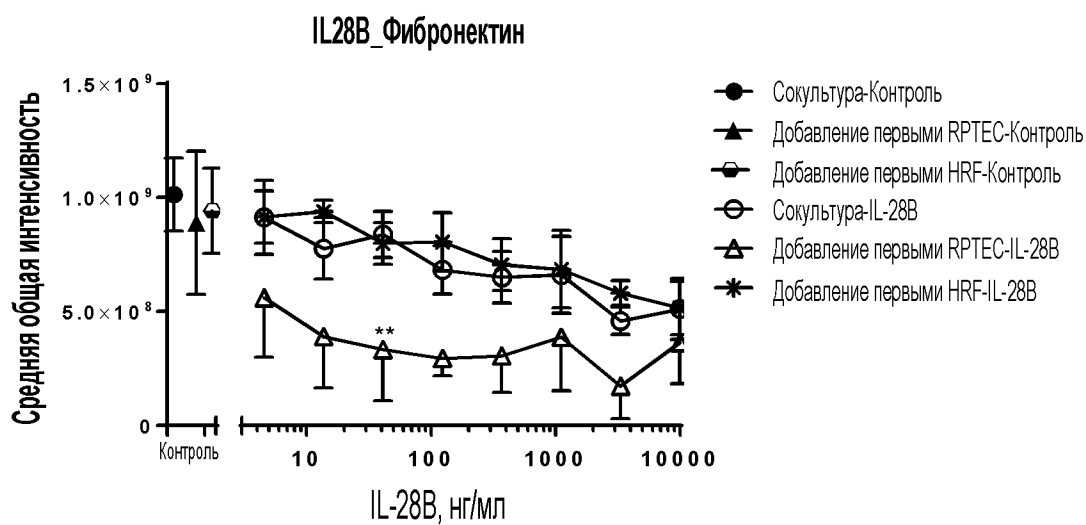
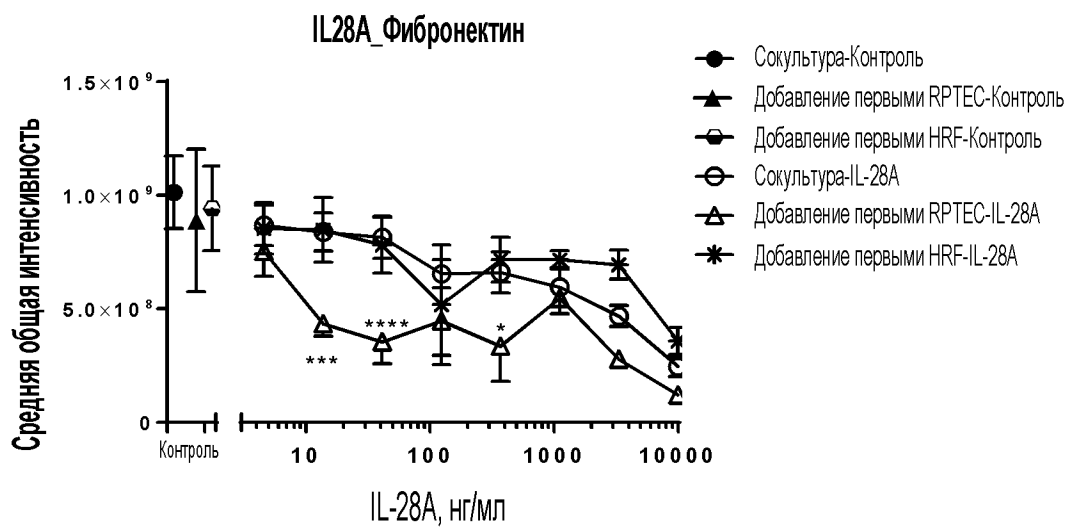
ФИГ. 14(с) (продолжение)

Эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ЕСМ сокультуры RPTEC почки-фибробласты и жизнеспособность клеток - добавление сначала - добавление сначала HRF



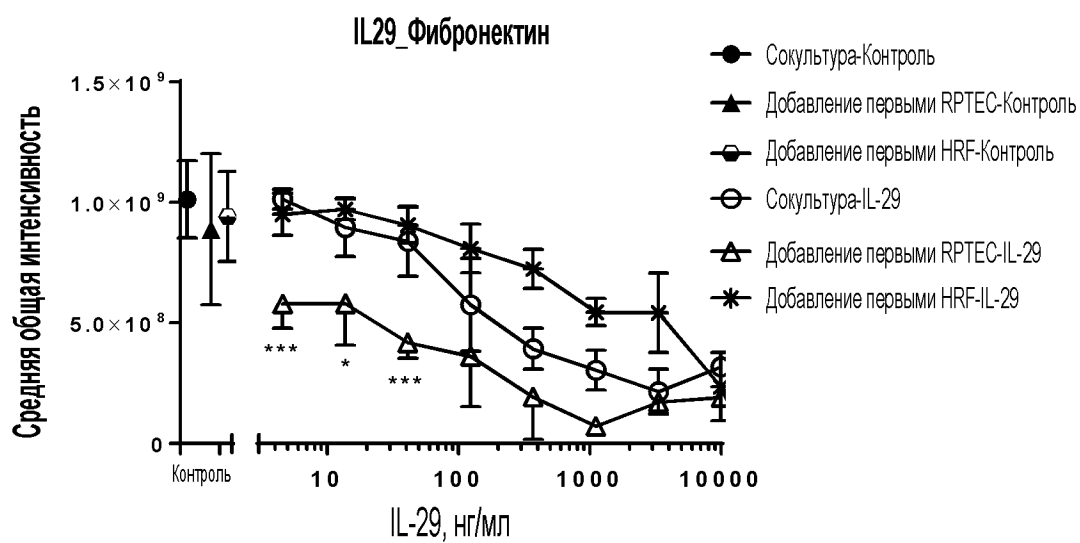
ФИГ. 15(а)

Сравнение форматов добавления в отношении эффекта IL-28A и IL-28B в сокультуре RPTEC почки-фибробласты, фибронектин



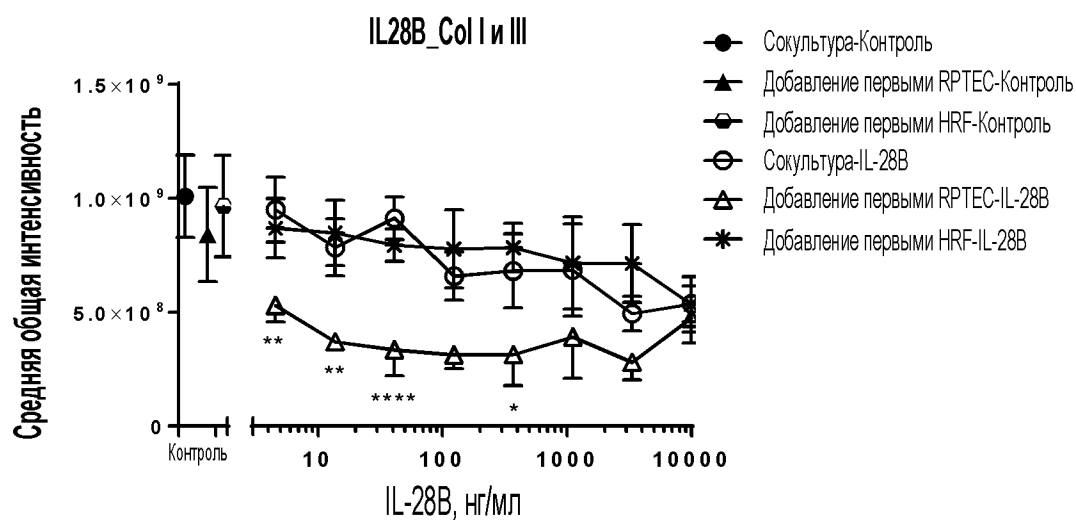
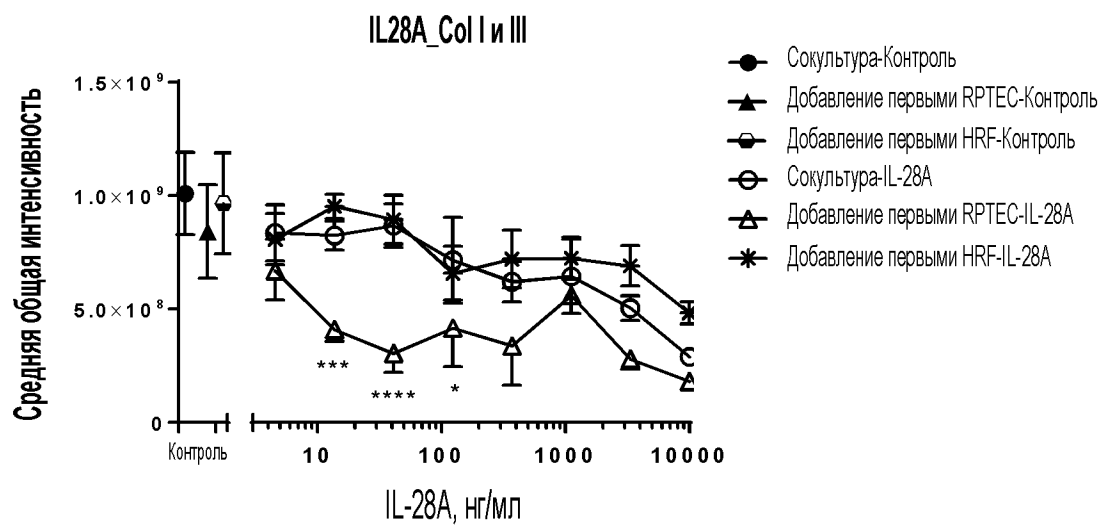
ФИГ. 15(а) (продолжение)

Сравнение форматов добавления в отношении эффекта IL-28A и IL-28B в сокультуре RPTEC почки-фибробласты, фибронектин



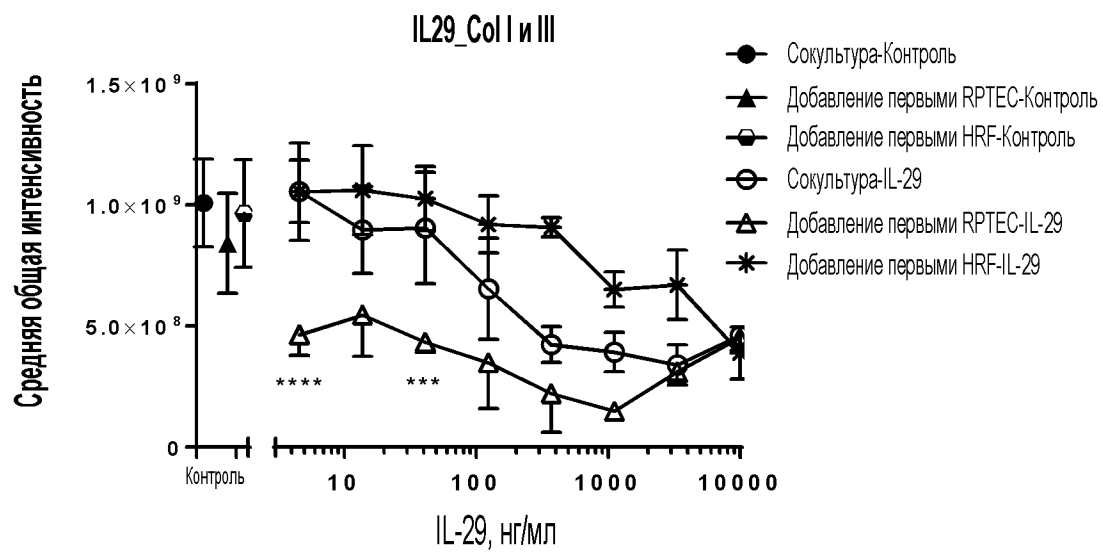
ФИГ. 15(b)

Сравнение форматов добавления в отношении эффекта IL-28A и IL-28B в сокультуре RPTEC почки-фибробласты, Col I и III



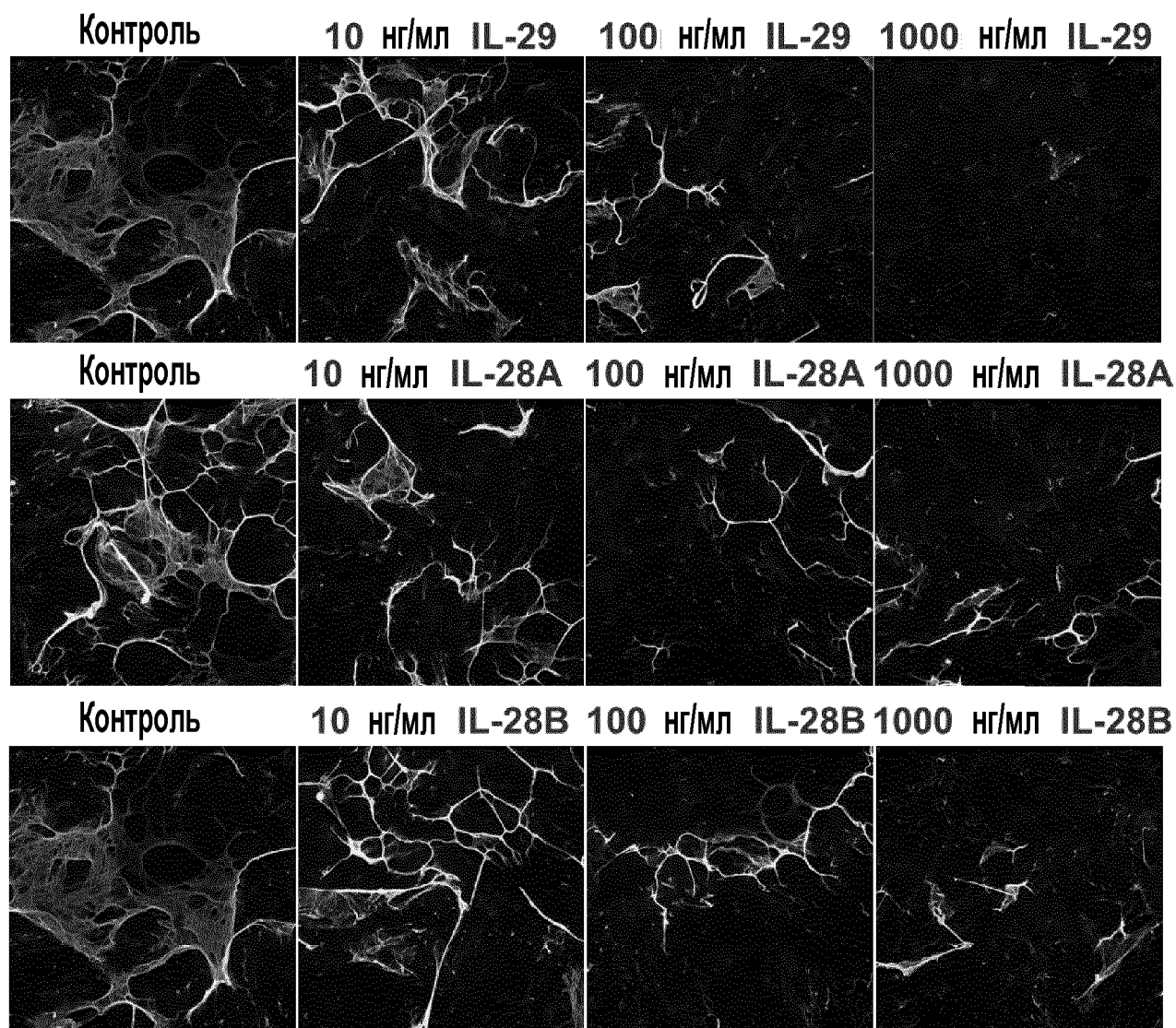
ФИГ. 15(b) (продолжение)

Сравнение форматов добавления в отношении эффекта IL-28A и IL-28B в сокультуре RPTEC почки-фибробласты, Col I и III

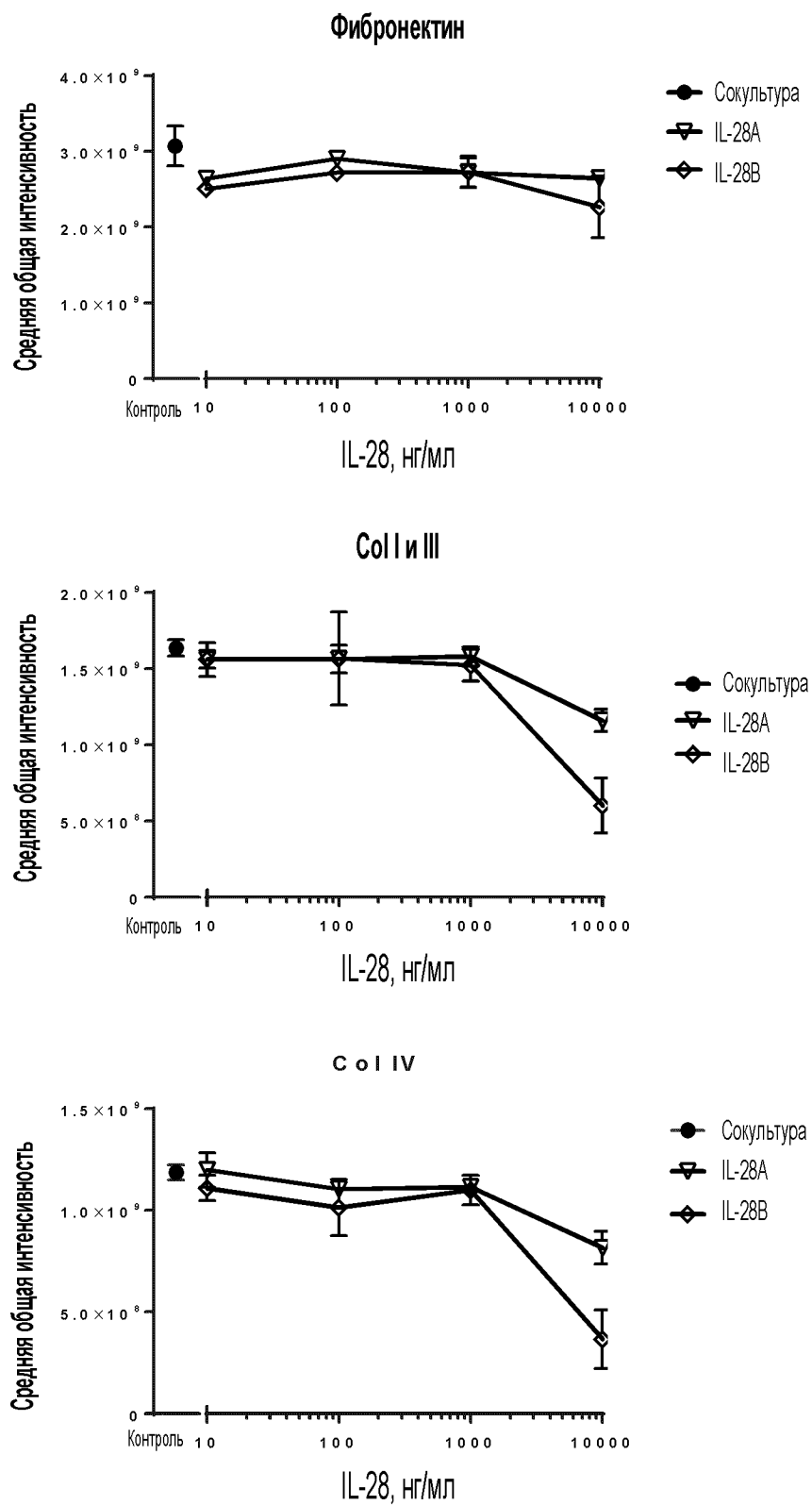


ФИГ. 16

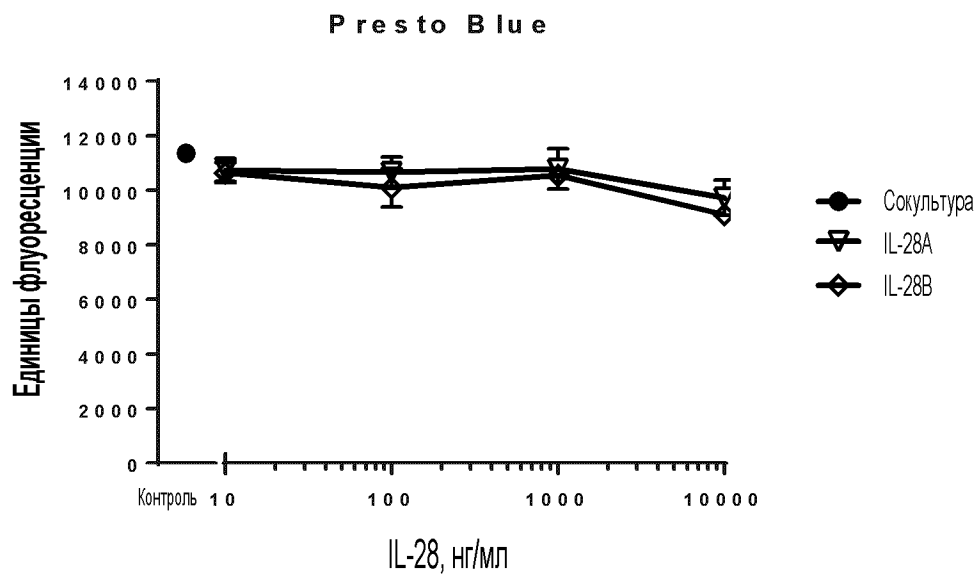
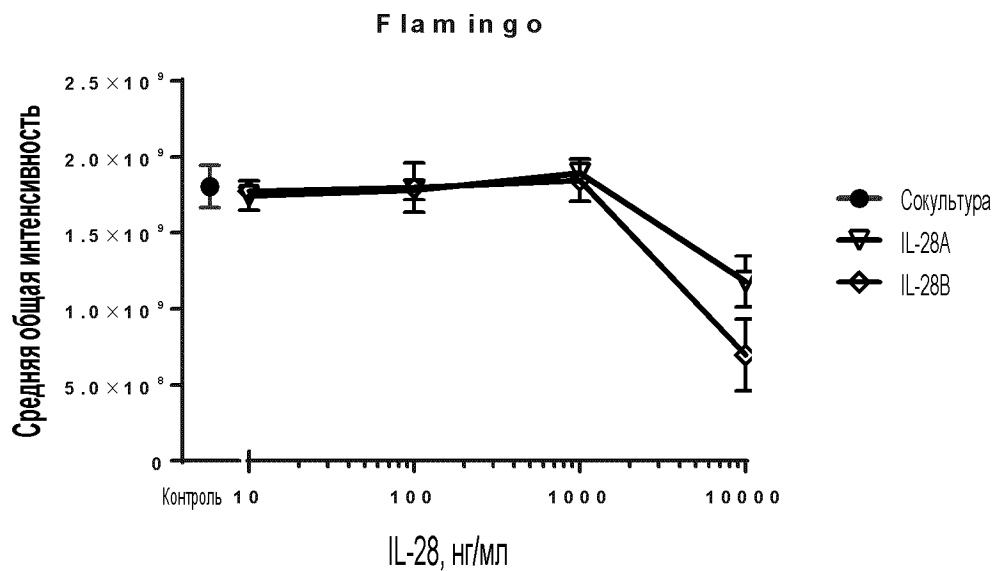
Многopараметрические изображения, демонстрирующие эффект IL-28A, IL-28B и IL-29 в ECM сокультуры RPTEC почек и фибробластов



ФИГ. 17

Эффект IL-28A и IL-28B в ECM сокультуры SAEpithelial легкого и фибробластов

ФИГ. 17 (продолжение)

Эффект IL-28A и IL-28B в ECM сокультуры SAEpithelial легкого и фибробластов, и жизнеспособность клеток

ФИГ. 18

Последовательности белков и ДНК для IFNL1, IFNL2, IFNL3 и IFNL4

Последовательность белка IFNL1 человека (Uniprot IDQ8IU54)

GPVPTSKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDLRLLQVRERPVALEAELALTLKVLE
 AAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKKESAGCLEASVTFNLFRLLTRDLKYVAD
 GNLCLRTSTHPEST

Последовательность ДНК IFNL1 человека (NM_172140 ДНК с интронами)

ORIGIN

```

1 aattaccttt tcactttaca cacatcatct tggattgccc attttgctg gctaaaaagc
61 agagccatgc cgctggggaa gcagttgcga tttagccatg gctgcagctt ggaccgtggt
121 gctggtgact ttggtgctag gcttggccgt ggcaggccct gtccccactt ccaagccac
181 cacaactggg aagggtctgc acattggcag gttcaaactt ctgtcaccac aggagctagc
241 gagcttcaag aaggccaggg acgccttgga agagtcaact aagctgaaaa actggagttg
301 cagctctcct gtcttccccg ggaattggga cctgaggctt ctccagggtg gggagcgccc
361 tgtggccttg gaggtctgagc tggccctgac gctgaaggct ctggaggccg ctgctggccc
421 agccctggag gacgtcctag accagcccct tcacaccctg caccacatcc tctcccagct
481 ccaggcctgt atccagcctc agcccacagc agggcccagg ccccgggggc gcctccacca
541 ctggctgcac cggctccagg agggccccc aaaggagtcc gctggctgcc tggaggcatc
601 tgtcaccttc aacctcttcc gcctcctcac gcgagacctc aaatatgtgg ccgatgggaa
661 cctgtgtctg agaacgtcaa cccaccctga gtccacctga cccccacac cttatttatg
721 cgctgagccc tactccttcc ttaattttatt tcctctcacc cttattttat gaagctgcag
781 ccctgactga gacatagggc tgagttttatt gttttacttt tatacattat gcacaaataa
841 acaacaagga attgga

```

Последовательность белка IFNL2 человека (Uniprot ID Q8IZJ0)

VPVARLHGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALTLKV
 LEATADTDPALVDVLDQPLHTLHHILSQLFRACIQPQPTAGPRTRGRLLHHWLYRLQEAPKKESPGCLEASVTFNLFRLLTRDLNC
 VASGDLCV

Последовательность ДНК IFNL2 человека (NM_172138 ДНК с интронами)

ORIGIN

```

1 tgggtgacag cctcagagtg tttcttctgc tgacaaagac cagagatcag gaatgaaact
61 agacatgact ggggactgca cgccagtgtt ggtgctgatg gcgcagtgac tgaccgtgac
121 tggagcagtt cctgtcgcca ggctccacgg ggctctccc gatgcaaggg gctgccacat
181 agcccagttc aagtccctgt ctccacagga gctgcaggcc ttttaaggagg ccaaagatgc
241 cttagaagag tcgcttctgc tgaaggactg cagggtgccac tcccgcctct tcccaggac
301 ctgggacctg aggcagctgc aggtgaggga gcgcccctat gctttggagg ctgagctggc
361 cctgacgctg aaggttctgg aggccaccgc tgacactgac ccagccctgg tggacgtctt
421 ggaccagccc cttcacaccc tgcaccatat cctctcccag ttccgggctt gtatccagcc
481 tcagcccacg gcagggccca ggaccgggg ccgcctccac cattggctgt accggctcca
541 ggaggcccca aaaaaggagt cccctggctg cctcgaggcc tctgtcact tcaacctctt
601 ccgcctcctc acgcgagacc tgaattgtgt tgccagtggg gaacctgtgt tctgacctc
661 ccaccagtca tgcaacctga gatttttatt ataaatttag cacttgtctt aattttattgc
721 caccagtcg ctat

```

ФИГ. 18 (продолжение)

Последовательности белков и ДНК для IFNL1, IFNL2, IFNL3 и IFNL4

Последовательность белка IFNL3 человека (Uniprot ID Q8IZ19)

VPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLKDKCRSRLFPRTWDLRQLQ
VRERPVALEAELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRHLH
HWLHRLQEAPKKESPGCLEASVTFNLFRLLTRDLNCSVASGDLCV

Последовательность ДНК IFNL3 человека (NM_172139 ДНК с интронами)

ORIGIN

```

1  ctgcattccc tcagctccct ttctctctgt gacacagaca tgaccgggga ctgcatgcca
61  gtgctggtgc tgatggccgc agtgctgacc gtgactggag cagttcctgt cgccaggctc
121 cgcggggctc tcccggatgc aaggggctgc cacatagccc agttcaagtc cctgtctcca
181 caggagctgc aggcctttaa gagggcctga gatgccttag aagagtcgct tctgctgaag
241 gactgcaagt gccgctcccg cctcttcccc aggacctggg acctgaggca gctgcaggtg
301 agggagcgcc ccgtggcttt ggaggctgag ctggccctga cgctgaaggc tctggaggcc
361 accgctgaca ctgacctgac cctgggggat gtcttgagac agccccttca caccctgcac
421 catatcctct cccagctccg ggccctgtat cagcctcagc ccacggcagg gcccaggacc
481 cggggcccgc tccaccattg gctgcaccgg ctccaggagg ccccaaaaaa ggagtccctc
541 ggctgcctcg aggcctctgt caccttcaac ctcttccgcc tctcacgcgc agacctgaat
601 tgtgttgcca gcggggacct gtgtgtctga ccttccgcc agtcatgcaa cctgag

```

Последовательность белка IFNL4 человека (Uniprot ID K9M1U5)

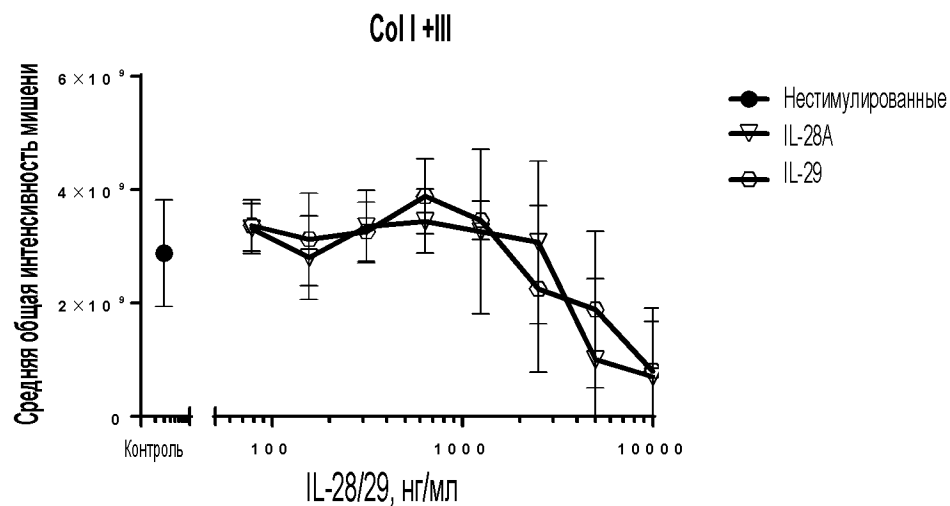
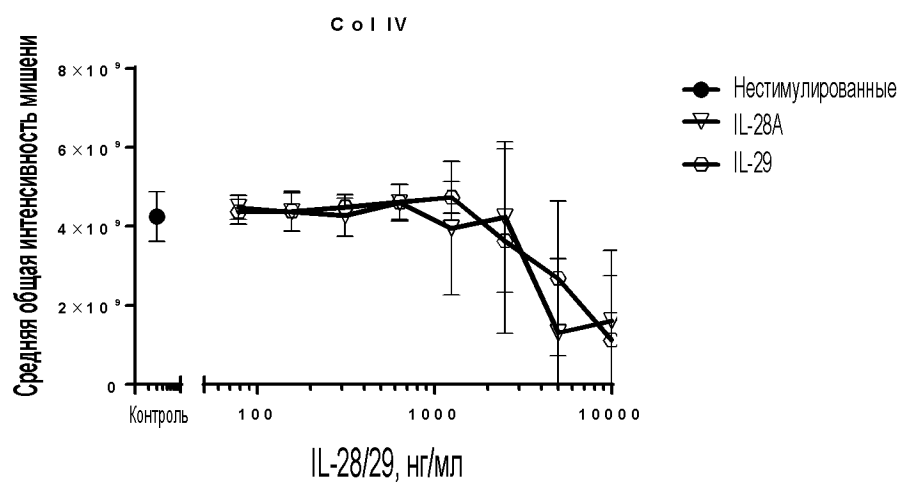
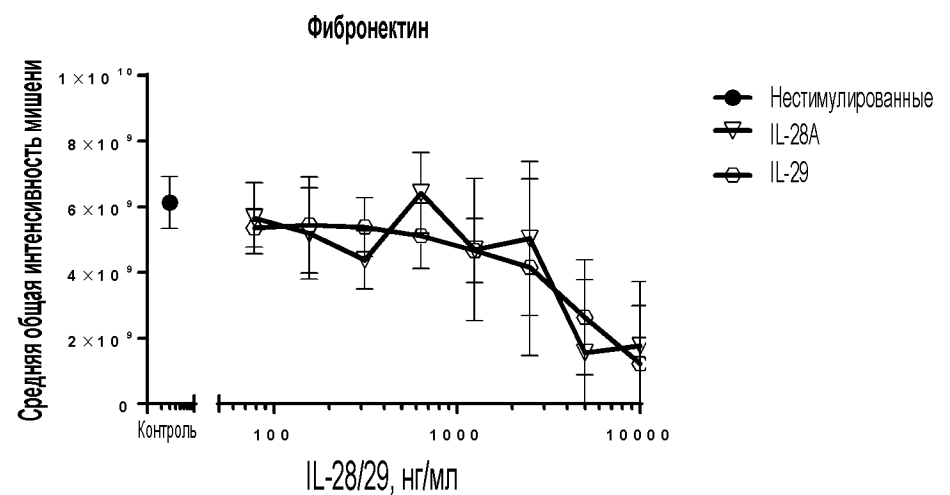
AAPRRCLLSHYRSLEPRTLAAAKALRDYEEEEALSWGQRNCSFRPRRDPPRPSSCARLRHVARG
IADAQAVLSGLHRSELLPGAGPILELLAAAGRDVAACLELARPSSRKVPGAQKRRHKPRRADSP
RCRKASVVFNLLRLLTWELRLAAHSGPCL

Последовательность мРНК IFNL4 человека (AFQ38559)

ATGCGGCCGAGTGTCTGGGCGCAGTGGCCGCGGGGCTGTGGGTCCTGTGCACGGTGATC
GCAGCGGCCCGCCGCGCTGCTCTCGCACTACCGCTCGCTGGAGCCCCGGACGCTG
GCGGCTGCCAAGGCGCTGAGGGACCGCTACGAGGAAGAGGCGCTGAGCTGGGGGCAGCGC
AACTGCTCCTTCGCCCCAGGAGGGATCCTCCGCGGCCATCGTCTGCGCTCGGCTCCGC
CACGTGGCCCGGGGATCGCGGACGCCCAGGCAGTGCTCAGCGGCCTGCACCGCTCGGAG
CTGCTCCCCGGCGCCGGCCGATCCTGGAGCTGCTGGCGGCCGCGGGGAGGGATGTGGCG
GCCTGCCTTGAGCTGGCACGGCCAGGCTCCTCCAGGAAGGTCCCCGGGGCCAGAGAGG
CGTCACAAACCCCGGAGAGCGGACTCGCTCGGTGCCGCAAAGCCAGCGTGGTCTTCAAC
CTCCTGCGCCTGCTCACGTGGGAGCTCCGGCTGGCTGCACACTCTGGGCTTGCCTCTGA

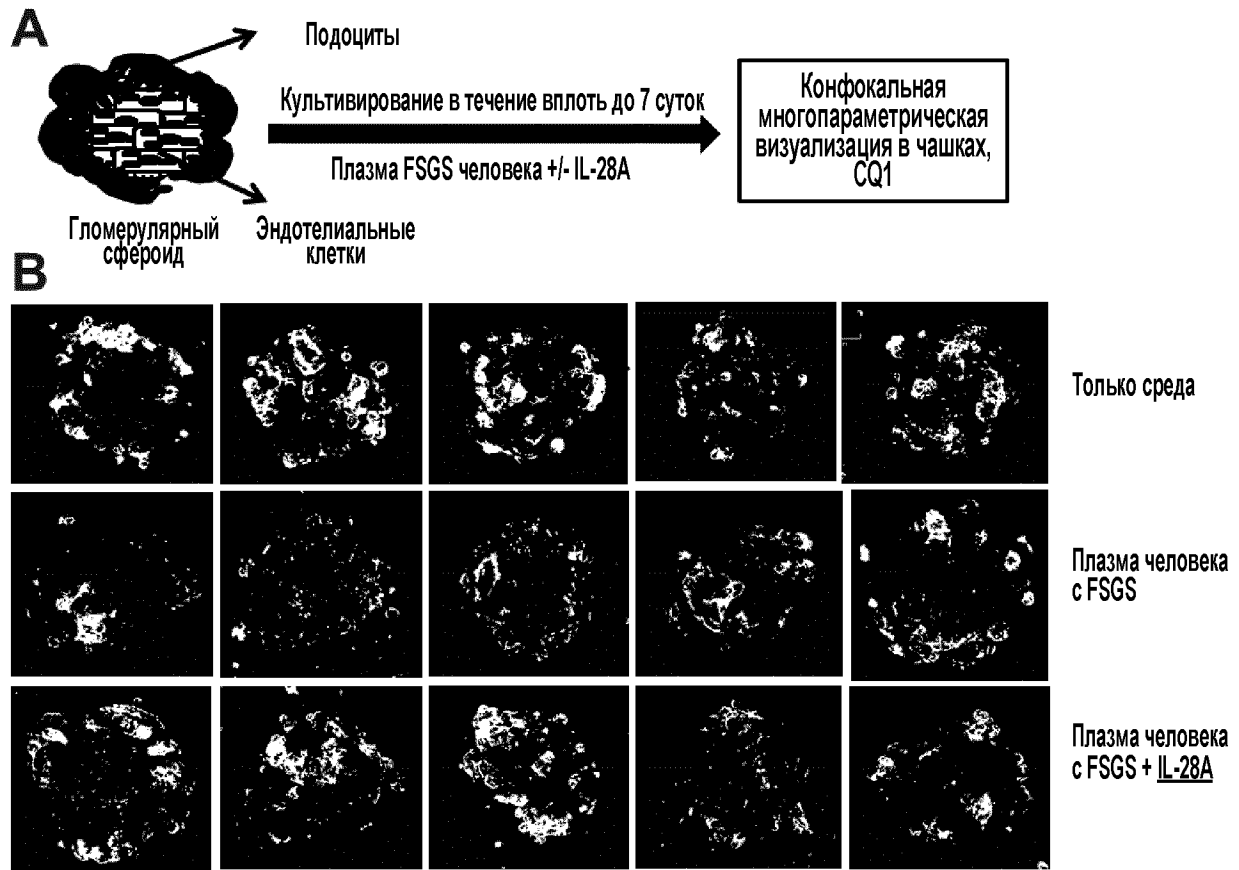
ФИГ. 19

Эффект IL-28A и IL-29 в модели фиброза печени *in vitro* на сокультуре звездчатых клеток печени человека и эпителиальных клеток

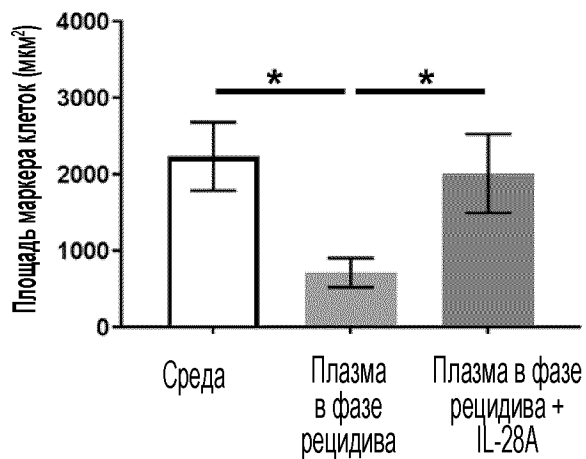


ФИГ. 20

Эффект IL-28A на выживаемость подоцитов в гломерулярной сфероидной 3D-модели гломерулосклероза *in vitro*



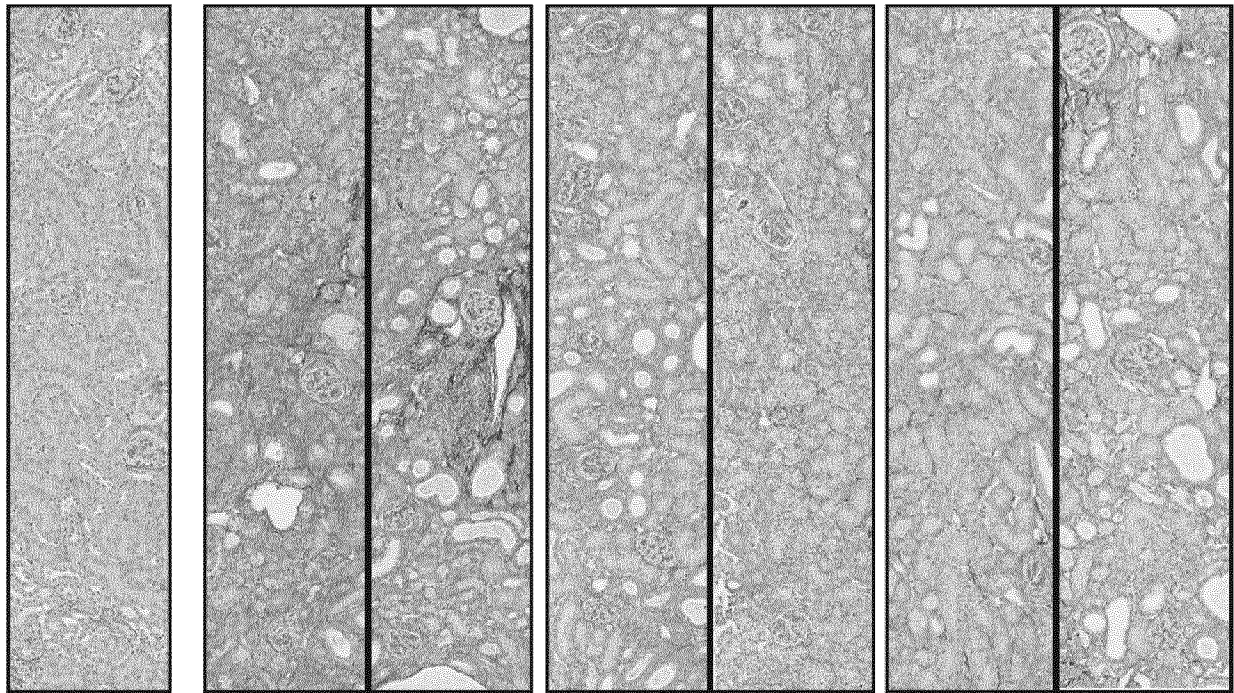
C Подсчет подоцитов в гломерулярном 3D-сфероиде



ФИГ. 21

Гидродинамическая трансфекция IL-28В мыши защищает от фиброза в модели фиброза почек с односторонней обструкцией мочеточника (UUO) у мышей

Окрашивание посредством PSR почек с фиброзом от мышей, которым вводили IL28В



Нормальная почка

После операции UUO,
контрольная HDT

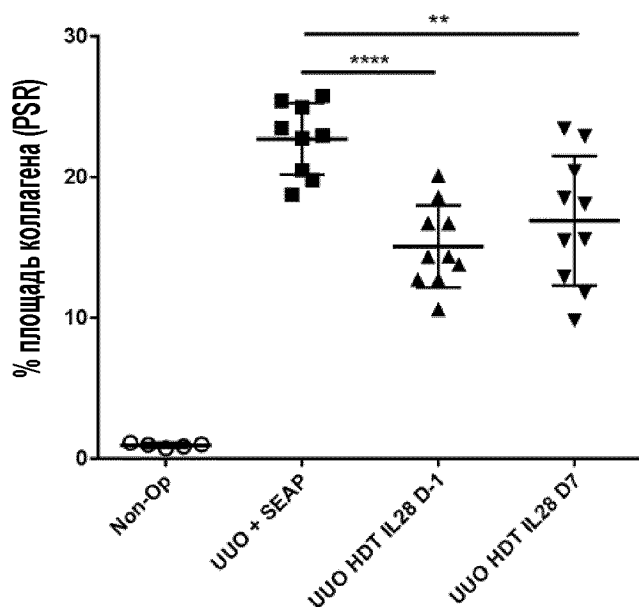
После операции UUO, HDT
посредством IL28В, сутки 1

После операции UUO, HDT
посредством IL28В, сутки 7

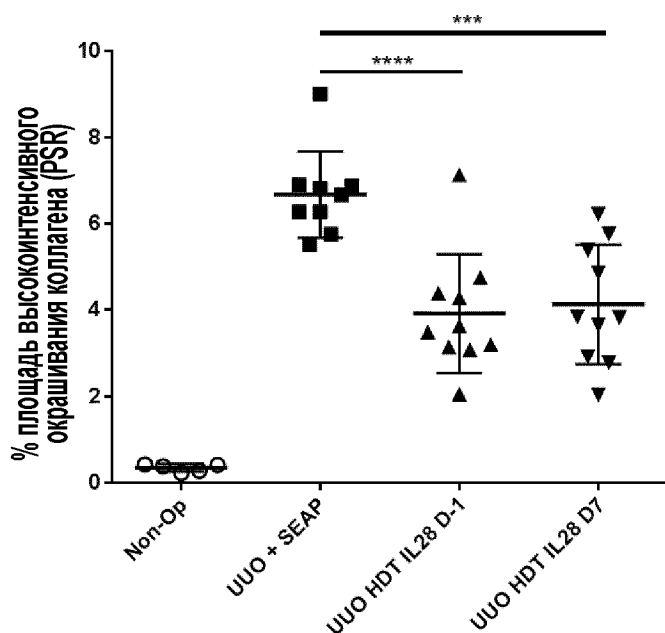
ФИГ. 21 (продолжение)

Гидродинамическая трансфекция IL-28В мыши в модели фиброза почек с односторонней обструкцией мочеточника у мышей сокращает интерстициальный коллаген

В Окрашивание посредством PSR коллагена Общая площадь окрашивания

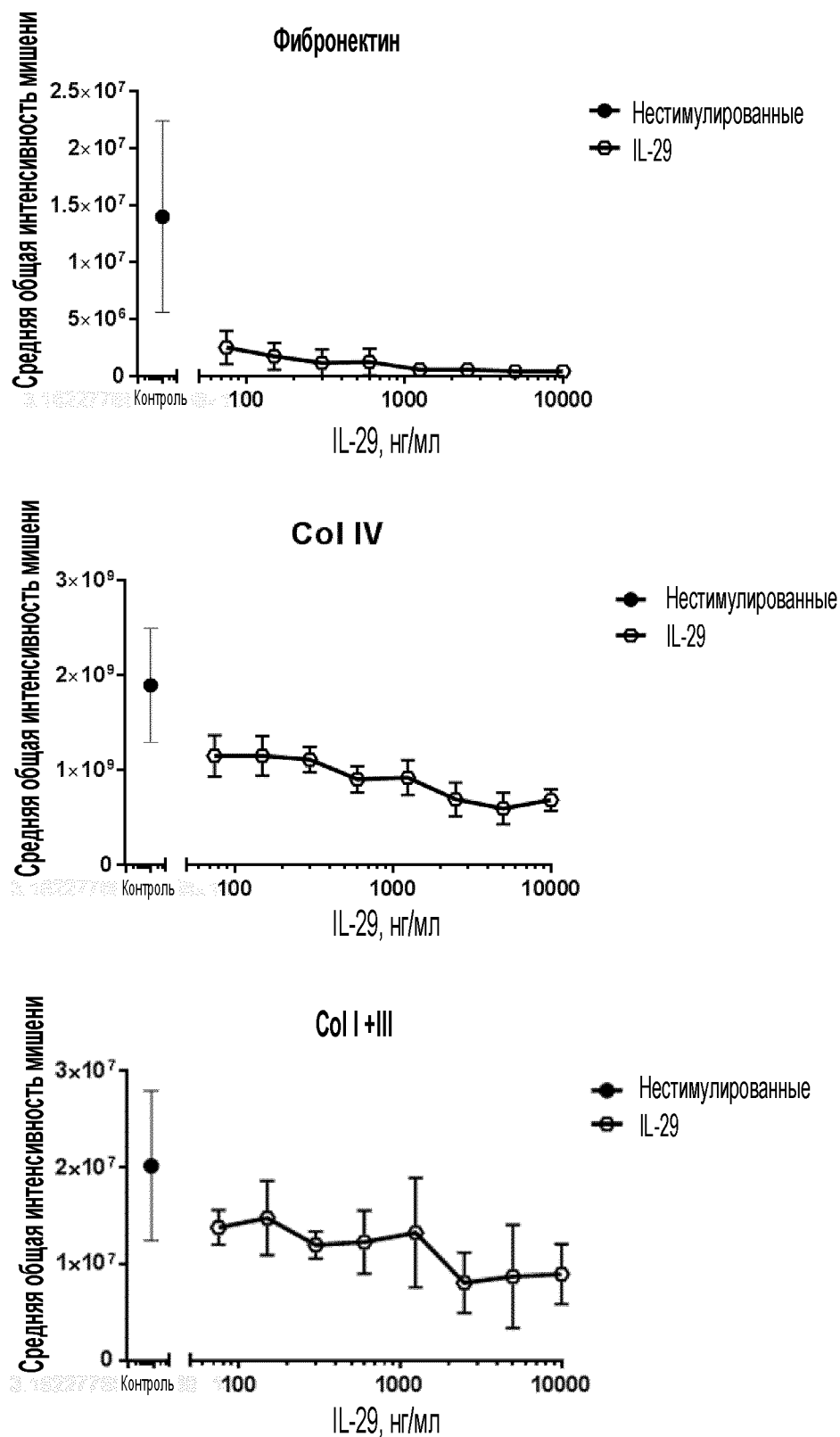


С Окрашивание посредством PSR коллагена Площадь высокоинтенсивного окрашивания



ФИГ. 22

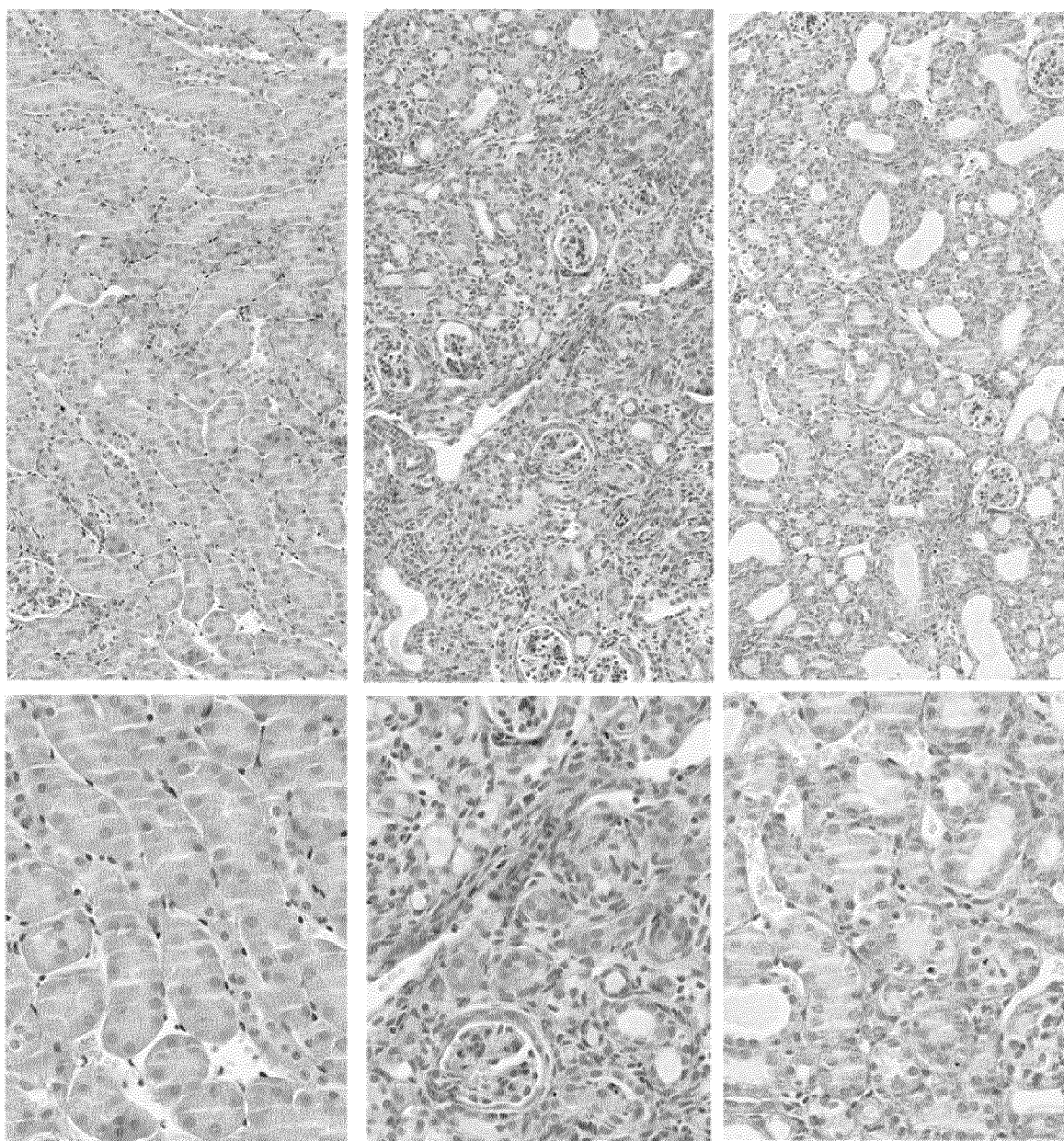
Эффект IL-29 в модели фиброза почек на монокультуре эпителиальных клеток проксимальных канальцев почек человека



ФИГ. 23(b)

Гидродинамическая трансфекция IL-29 человека защищает от фиброза в модели фиброза почек с односторонней обструкцией мочеточника (UUO) на мышах

Окрашивание посредством PSR почек с фиброзом от мышей, которым вводили IL29



Нормальная почка

UUO+контрольная HDT

UUO + IL-29 HDT

ФИГ. 23(с)

Гидродинамическая трансфекция IL-29 человека защищает от фиброза
в модели фиброза почек с односторонней обструкцией мочеточника (UUO)
на мышах

