

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090691** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2020.12.07

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.10.12

(54) **ЛЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ОПОСРЕДОВАННОГО ГМК**

(31) 1716733.9

(72) Изобретатель:

(32) 2017.10.12

**Кук Стюарт Александр, Шефер  
Себастиан, Лим Вэй Вэнь, Ын  
Бенджамин Вэй Мин (SG)**

(33) GB

(86) PCT/EP2018/077940

(87) WO 2019/073057 2019.04.18

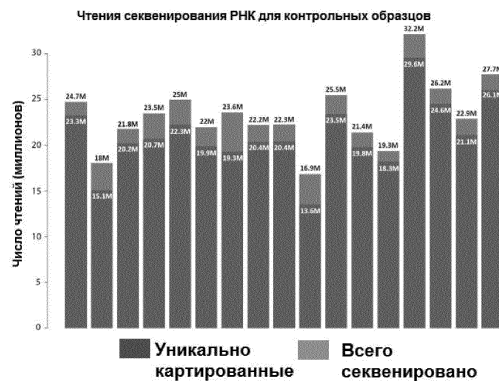
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**СИНГАПУР ХЭЛС СЕРВИСЕС ПТЕ.  
ЛТД.; НЭШНЛ ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
СИНГАПУР (SG)**

**Нилова М.И. (RU)**

(57) Предложены диагностика, лечение и профилактика заболеваний и состояний, связанных с дисфункцией гладкомышечных клеток (ГМК), посредством ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов.



**A1**

**202090691**

**202090691**

**A1**

## ЛЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ОПОСРЕДОВАННОГО ГМК

### Область техники

Настоящее изобретение относится к диагностике, лечению и профилактике заболеваний и состояний, связанных с дисфункцией гладкомышечных клеток (ГМК).

5

### Уровень техники

Дисфункция гладкомышечных клеток (ГМК) наблюдается при многих заболеваниях и состояниях, при которых различные вышестоящие факторы развития заболевания стимулируют нормальные ГМК к аберрантной пролиферации, гипертрофии, миграции, дедифференцировке и

10 продуцированию внеклеточного матрикса.

ГМК, имеющие этот связанный с заболеванием фенотип, в данной области техники называют по-разному: «секреторными ГМК» (см., например, Rainger and Nash *Circ Res* 88 (6), 615-622 (2001)), «синтетическими ГМК» (см., например, Beamish et al., *Tissue Eng Part B Rev.* (2010) 16(5): 467–491) и «мигрирующими ГМК» (см., например, Sandison et al., *J Physiol.* (2016);594(21):6189-6209). В

15 настоящей заявке авторы называют ГМК этого фенотипа «секреторными ГМК».

В то время как различные вышестоящие факторы приводят к дисфункции ГМК, существуют некоторые общие нижестоящие факторы, которые поддерживают неблагоприятный, связанный с

20 заболеванием, секреторный фенотип ГМК.

Заболевания, характеризующиеся дисфункцией сосудистых ГМК (СГМК), включают атеросклероз, гипертензию, сосудистые аневризмы, стеноз и рестеноз сосудов, атеросклероз, надклапанный стеноз, легочную артериальную гипертензию, плексиформные поражения, фиброзномышечную

25 дисплазию, телеангиэктазию и другие. ГМК являются компонентами многих внутренних органов и формируют сократительный аппарат пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки, мочеточников и мочевого пузыря. Нарушение функции ГМК во внутренних органах может привести к ахалазии, дисфагии, стриктурам кишечника, стенозу привратника, диарее, запору, дивертикулезу, заболеванию почек и мочевого пузыря. ГМК также играют важную роль в функции

30 легких, а масса и сократимость ГМК бронхов патологически связаны с астмой, муковисцидозом, ХОБЛ (хронической обструктивной болезнью легких), ОРДС (острым респираторным дистресс-синдромом) и другими респираторными заболеваниями. Дисфункция ГМК при астме вызвана изменениями фенотипа и поведения ГМК в ответ на воздействия окружающей среды и химические стимулы, такие как хемокины, интерлейкины и другие цитокины.

35

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к лечению патологии, связанной с активностью гладкомышечных клеток (ГМК) (например, активностью секреторных ГМК) посредством

40 ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к агенту, способному ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения в способе лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК).

5

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения для производства лекарственного средства для применения в способе лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК).

10

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), включающему введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

15

В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения в некоторых вариантах реализации ГМК представляют собой секреторные ГМК. Соответственно, в некоторых вариантах реализации заболевание, при котором патологически вовлечены ГМК, представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК. В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения ГМК и/или секреторные ГМК представляют собой сосудистые ГМК (СГМК). Соответственно, в некоторых вариантах реализации заболевание, при котором патологически вовлечены ГМК или секреторные ГМК, представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены сосудистые ГМК (СГМК).

20

В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения в некоторых вариантах реализации агент представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11. В некоторых вариантах реализации агент выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой рецептор-ловушку IL-11. В некоторых вариантах реализации агент способен снижать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.

30

В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения в некоторых вариантах реализации заболевание представляет собой заболевание сердечно-сосудистой системы, пищеварительной системы, выделительной системы, дыхательной системы, почечной системы или репродуктивной системы. В некоторых вариантах реализации заболевание, при котором патологически вовлечены ГМК, выбрано из группы, состоящей из атеросклероза, гипертензии, сосудистой аневризмы, синдрома Марфана, аневризмы аорты, синдрома Фурлонга, синдрома Сфринтцена-Голдберга, синдрома Луиса-Дитца, семейного синдрома аневризмы грудного отдела

40

аорты, синдрома извитости артерий, аневризмы сосудов головного мозга, стеноза и рестеноза сосудов, атеросклероза, фиброзно-мышечной дисплазии (ФМД), надклапанного стеноза, стеноза почечной артерии, легочной артериальной гипертензии (ЛАГ), плексиформных поражений, фиброзно-мышечной дисплазии, телеангиэктазии, ахалазии, дисфагии, диареи, запора, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), целиакии, синдрома раздраженного кишечника, болезни Крона, язвенного колита, стриктуры кишечника, дивертикулеза, заболевания почечной системы, фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС), IgA-нефропатии, серповидного гломерулонефрита, волчаночного нефрита, диабетической нефропатии (ДН), болезни мочевого пузыря, болезни легких, астмы, муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), системного склероза, синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS), лейомиомы, лейомиосаркомы и синдрома Германски-Пудлака (СГП).

В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения в некоторых вариантах реализации указанный способ лечения или предупреждения включает введение агента субъекту, у которого повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11. В некоторых вариантах реализации указанный способ лечения или предупреждения включает введение агента субъекту, у которого определено, что повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11. В некоторых вариантах реализации указанный способ лечения или предупреждения включает определение того, повышена ли экспрессия IL-11 или рецептора IL-11 у субъекта, и введение агента субъекту, у которого повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК), включающему приведение ГМК в контакт с агентом, способным ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК) у субъекта, включающему введение указанному субъекту агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения пригодности субъекта для лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), с помощью агента, способного ингибировать действие интерлейкина-11 (IL-11), причем способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли у указанного субъекта экспрессия IL-11 или рецептора интерлейкина-11 (IL-11R).

40



В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу выбора субъекта для лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), с помощью агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, причем способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли у указанного субъекта экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или риска развития заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), у субъекта, причем способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышения экспрессии интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 в образце, полученном от указанного субъекта. В некоторых вариантах реализации указанный способ представляет собой способ подтверждения диагноза заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК, у субъекта с подозрением на наличие заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает выбор субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обеспечения прогноза для субъекта, имеющего заболевание, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или с подозрением на его наличие, причем способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 в образце, полученном от указанного субъекта, и, на основании определения, обеспечение прогноза лечения субъекта агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает выбор субъекта, у которого, как было определено, повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11, для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или риска развития заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), у субъекта, причем способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более генетических факторов у указанного субъекта, позволяющих прогнозировать повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или повышение опосредованной IL-11 передачи сигналов. В некоторых вариантах реализации указанный способ представляет собой способ подтверждения диагноза заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), у субъекта с подозрением на наличие заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК). В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает выбор субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обеспечения прогноза для субъекта, имеющего заболевание, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки

(ГМК), или с подозрением на его наличие, причем способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более генетических факторов у указанного субъекта, позволяющих прогнозировать повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или повышение опосредованной IL-11 передачи сигналов.

5

## Описание

### Интерлейкин-11 и рецепторы IL-11

Интерлейкин-11 (IL-11), также известный как фактор, ингибирующий адипогенез, является плейотропным цитокином и членом семейства цитокинов IL-6, которое включает IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, онкостатин, лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), кардиотрофин-1 (CT-1), кардиотрофин-подобный цитокин (CLC), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) и нейропозитин (NP-1).

Интерлейкин-11 (IL-11) экспрессируется в различных типах мезенхимальных клеток<sup>1</sup>. Геномные последовательности IL-11 были картированы на хромосоме 19 и центромерной области хромосомы 7<sup>1</sup>, и транскрибируются с каноническим сигнальным пептидом, обеспечивающим эффективную секрецию из клеток. Комплекс активаторного белка IL-11, cJun/AP-1, расположенный внутри его промоторной последовательности, имеет решающее значение для регуляции базальной транскрипции IL-11<sup>1</sup>. Незрелая форма человеческого IL-11 представляет собой полипептид из 199 аминокислот, тогда как зрелая форма IL-11 кодирует белок из 178 аминокислотных остатков (Garbers and Scheller., Biol. Chem. 2013; 394(9):1145-1161).

Аминокислотная последовательность человеческого IL-11 доступна под номером доступа в UniProt P20809 (P20809.1 GI:124294; SEQ ID NO: 1). Рекомбинантный человеческий IL-11 (опрелвекин) также коммерчески доступен. Также был клонирован и секвенирован IL-11 от других видов, включая мышь, крысу, свинью, корову, несколько видов костных рыб и приматов.

В данном описании «IL-11» относится к IL-11 от любых видов и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 от любых видов. В предпочтительных вариантах реализации вид представляет собой человека (*Homo sapiens*). Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 необязательно могут быть охарактеризованы как обладающие по меньшей мере 70%, предпочтительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности незрелого или зрелого IL-11 от данного вида, например, человека. Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 могут необязательно характеризоваться способностью связывать IL-11R $\alpha$  (предпочтительно от того же вида) и стимулировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих IL-11R $\alpha$  и gp130 (например, как описано в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11); или Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80). Фрагмент IL-11 может иметь любую длину (по количеству аминокислот), хотя необязательно может составлять по меньшей мере 25% длины зрелого IL-11 и может иметь максимальную длину, составляющую 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины зрелого IL-11. Фрагмент IL-11 может иметь минимальную длину 10 аминокислот и максимальную длину 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 195 аминокислот.

- IL-11 передает сигналы посредством гомодимера универсально экспрессируемого гликопротеина 130 (gp130; также известного как гликопротеин 130, IL-6ST, IL-6-бета или CD130). Gp130 представляет собой трансмембранный белок, который образует одну субъединицу рецептора цитокинов типа I с семейством рецепторов IL-6. Специфичность достигается за счет  $\alpha$ -субъединицы рецептора IL-11 (IL-11R $\alpha$ ), которая напрямую не участвует в передаче сигнала, хотя первоначальное событие связывания цитокинов с  $\alpha$ -рецептором приводит к образованию конечного комплекса с gp130.
- 5
- 10 Человеческий gp130 (включая сигнальный пептид из 22 аминокислот) представляет собой белок из 918 аминокислот, а зрелая форма состоит из 866 аминокислот, включая внеклеточный домен из 597 аминокислот, трансмембранный домен из 22 аминокислот и внутриклеточный домен из 277 аминокислот. Внеклеточный домен белка содержит цитокин-связывающий участок (СВМ) gp130. СВМ gp130 содержит Ig-подобный домен D1 и домены фибронектина III типа D2 и D3 gp130.
- 15 Аминокислотная последовательность человеческого gp130 доступна под номером доступа в UniProt P40189-1 (SEQ ID NO: 2).

- Человеческий IL-11R $\alpha$  представляет собой полипептид из 422 аминокислот (UniProt Q14626; SEQ ID NO: 3) и его нуклеотидная и аминокислотная последовательность обладает ~ 85%
- 20 идентичностью мышиному IL-11R $\alpha$  (Du and Williams., Blood Vol, 89, No,11, June 1, 1997). Сообщалось о двух изоформах IL-11R $\alpha$ , которые различаются по цитоплазматическому домену (см. источник Du and Williams, цитируемый выше).  $\alpha$ -цепь рецептора IL-11 (IL-11R $\alpha$ ) имеет много структурных и функциональных сходств с  $\alpha$ -цепью рецептора IL-6 (IL-6R $\alpha$ ). Внеклеточный домен обладает 24% идентичностью аминокислот, включая характерный консервативный мотив Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). Короткий цитоплазматический домен (34 аминокислоты) лишен областей Box 1 и 2, которые необходимы для активации сигнального пути JAK/STAT.
- 25

- Сайты связывания рецептора на мышином IL-11 были картированы, и было идентифицировано три сайта – сайты I, II и III. Связывание с gp130 уменьшается за счет замен в области сайта II и за счет замен в области сайта III. Мутанты сайта III не демонстрируют обнаружимой агонистической активности и обладают антагонистической активностью в отношении IL-11R $\alpha$  (Cytokine Inhibitors, глава 8; под редакцией Gennaro Ciliberto and Rocco Savino, Marcel Dekker, Inc. 2001).
- 30

- В данном описании рецептор IL-11 относится к полипептиду или полипептидному комплексу, способному связывать IL-11. В некоторых вариантах реализации рецептор IL-11 способен связывать IL-11 и вызывать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор.
- 35

- Рецептор IL-11 может происходить от любого вида и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи рецептора IL-11 от любого вида. В предпочтительных вариантах реализации вид представляет собой человека (*Homo sapiens*).
- 40

В некоторых вариантах реализации рецептор IL-11 может представлять собой IL-11R $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации рецептор IL-11 может представлять собой полипептидный комплекс, содержащий IL-11R $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации рецептор IL-11 может представлять собой полипептидный комплекс, содержащий IL-11R $\alpha$  и gp130. В некоторых вариантах реализации рецептор IL-11 может представлять собой gp130 или комплекс, содержащий gp130, с которым связывается IL-11.

Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11R $\alpha$  необязательно могут быть охарактеризованы как обладающие по меньшей мере 70%, предпочтительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности IL-11R $\alpha$  от данного вида, например, человека. Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11R $\alpha$  могут необязательно характеризоваться способностью связывать IL-11 (предпочтительно от того же вида) и стимулировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих IL-11R $\alpha$  и gp130 (например, как описано в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) или Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80). Фрагмент рецептора IL-11 может иметь любую длину (по количеству аминокислот), хотя необязательно может составлять по меньшей мере 25% длины зрелого IL-11R $\alpha$  и может иметь максимальную длину, составляющую 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины зрелого IL-11R $\alpha$ . Фрагмент рецептора IL-11 может иметь минимальную длину 10 аминокислот и максимальную длину 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400 или 415 аминокислот.

#### Передача сигналов IL-11

IL-11 связывается с IL-11R с низкой аффинностью ( $K_d \sim 10$  нмоль/л), и одного взаимодействия между этими партнерами по связыванию недостаточно для передачи биологического сигнала. Для генерации высокоаффинного рецептора ( $K_d \sim 400-800$  пмоль/л), способного к передаче сигнала, необходима совместная экспрессия IL-11R $\alpha$  и gp130 (Curtis et al (Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12; Hilton et al., EMBO J 13:4765, 1994; Nandurkar et al., Oncogene 12:585, 1996). Связывание IL-11 с IL-11R $\alpha$  на клеточной поверхности индуцирует гетеродимеризацию, фосфорилирование тирозина, активацию gp130 и нисходящую передачу сигнала, преимущественно через митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK), а также янус-киназу/сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции (Jak/STAT) (см. источник Garbers and Scheller, цитируемый выше).

В принципе, растворимый IL-11R может также образовывать биологически активные растворимые комплексы с IL-11 (Pflanz et al., 1999 FEBS Lett, 450, 117-122), что повышает вероятность того, что, подобно IL-6, IL-11 может в некоторых случаях связывать растворимый IL-11R $\alpha$  до связывания gp130 на клеточной поверхности (см. источник Garbers and Scheller, цитируемый выше). Curtis et al (Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12) описывают экспрессию альфа-цепи растворимого мышинового рецептора IL-11 (sIL-11R) и исследовали передачу сигнала в клетках, экспрессирующих gp130. В присутствии gp130, но не трансмембранного IL-11R, sIL-11R опосредует IL-11-зависимую дифференцировку клеток лейкоза M1 и пролиферацию в клетках Ba/F3 и ранние внутриклеточные

события, включая фосфорилирование gp130, STAT3 и SHP2, схожее с передачей сигнала посредством трансмембранного IL-11R. Недавно была продемонстрирована активация передачи сигнала посредством связанного с клеточной мембраной gp130 с помощью IL-11, связанного с растворимым IL-11R $\alpha$  (Lokau et al., 2016 Cell Reports 14, 1761–1773). Эта так называемая *транс-*передача сигнала IL-11 может быть важной для патогенеза заболевания, однако ее роль в заболевании человека еще не изучена.

В контексте настоящей заявки термин «*транс-передача сигналов IL-11*» используется для обозначения передачи сигналов, которая инициируется связыванием IL-11, связанным с IL-11R $\alpha$ , с gp130. IL-11 может быть связан с IL-11R в виде нековалентного комплекса. Gp130 является мембранносвязанным и экспрессируется клеткой, в которой происходит передача сигналов, после связывания комплекса IL-11:IL-11R $\alpha$  с gp130. В некоторых вариантах реализации IL-11R $\alpha$  может представлять собой растворимый IL-11R $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации растворимый IL-11R $\alpha$  представляет собой растворимую (секретируемую) изоформу IL-11R $\alpha$  (например, в которой отсутствует трансмембранный домен). В некоторых вариантах реализации растворимый IL-11R $\alpha$  представляет собой продукт, высвобождаемый при протеолитическом расщеплении внеклеточного домена связанного с клеточной мембраной IL-11R $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации IL-11R $\alpha$  может быть мембранносвязанным, и передача сигнала посредством gp130 может инициироваться связыванием IL-11, связанным с IL-11R $\alpha$ , связанным с клеточной мембраной, и называется «*цис-*передачей сигнала IL-11».

Было показано, что опосредованная IL-11 передача сигналов стимулирует гемопоэз, стимулирует активность остеокластов, стимулирует нейрогенез, ингибирует адипогенез, снижает экспрессию провоспалительных цитокинов, модулирует метаболизм внеклеточного матрикса (ECM) и опосредует нормальный контроль роста клеток эпителия желудочно-кишечного тракта<sup>1</sup>.

Физиологическая роль интерлейкина 11 (IL-11) остается неясной. IL-11 наиболее тесно связан с активацией гемопоэтических клеток и с продукцией тромбоцитов, но также предполагают, что он является провоспалительным, а также противовоспалительным, проангиогенным и важным для неоплазии. Известно, что TGF $\beta$ 1 или повреждение ткани могут вызывать экспрессию IL-11 (Zhu, M. et al. PLOS ONE 10, (2015); Yashiro, R. et al. J. Clin. Periodontol. 33, 165–71 (2006); Obana, M. et al. Circulation 121, 684–91 (2010); Tang, W et al. J. Biol. Chem. 273, 5506–13 (1998)).

IL-11 является важным посттранскрипционным модулятором TGF $\beta$ -опосредованной передачи сигналов. Было показано, что TGF $\beta$ 1 стимулирует область промотора AP-1 IL-11, и было показано, что вызванная TGF $\beta$  секреция IL-11 вызывает активацию киназ ERK p42/44 и MAP p38 в миофибробластах кишечника (Bamba et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. (2003) 285(3):G529-38). Ингибиторы MAP-киназы способны значительно снижать вызванную TGF $\beta$  секрецию IL-11, и было показано, что опосредованная киназой MAP p38 стабилизация мРНК имеет решающее значение для вызванной TGF $\beta$  секреции IL-11.

В контексте настоящей заявки термин «передача сигналов IL-11» и «опосредованная IL-11 передача сигналов» относится к передаче сигнала, опосредованной связыванием IL-11 или его фрагмента, выполняющего функцию зрелой молекулы IL-11, с рецептором IL-11.

#### 5 Гладкомышечные клетки (ГМК)

Гладкомышечные клетки (ГМК) являются типом мезенхимальных клеток, присутствующим во многих органах организма. В сосудистой системе сосудистые гладкомышечные клетки (СГМК) образуют срединный слой всех крупных артерий и артериол и необходимы для поддержания тонуса сосудов и артериального давления. ГМК также присутствуют во многих внутренних органах и формируют сократительный аппарат пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки, мочеточников и мочевого пузыря. ГМК также присутствуют в дыхательных путях дыхательной системы (например, легких).

В вариантах реализации в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения гладкомышечная клетка (ГМК) может представлять собой сосудистую ГМК (СГМК), ГМК кишечника (КГМК), ГМК дыхательных путей (ДГМК), ГМК из кровеносного сосуда, артерии, артериолы, внутреннего органа, органа пищеварительной системы, органа мочевыделительной системы, пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки, мочеточника, мочевого пузыря, почки (например, мезангиальную клетку), органа дыхательной системы, дыхательных путей, трахеи, легкого, бронхов или бронхиол.

В вариантах реализации в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения гладкомышечная клетка (ГМК) может представлять собой сосудистую ГМК (СГМК), ГМК кишечника (КГМК), ГМК из кровеносного сосуда, артерии, артериолы, внутреннего органа, органа пищеварительной системы, органа мочевыделительной системы, пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки, мочеточника, мочевого пузыря, почки (например, мезангиальную клетку). В вариантах реализации ГМК не является ГМК дыхательных путей (ДГМК) или ГМК органа дыхательной системы, дыхательных путей, трахеи, легкого, бронхов или бронхиол. В вариантах реализации ГМК не является сосудистой ГМК (СГМК). В вариантах реализации ГМК не является ГМК кишечника (КГМК). В вариантах реализации ГМК не является одной или более из следующего: ГМК из кровеносного сосуда, артерии, артериолы, внутреннего органа, органа пищеварительной системы, органа мочевыделительной системы, пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки, мочеточника, мочевого пузыря, почки (например, мезангиальной клеткой).

При нормальных физиологических условиях ГМК имеют сократительный фенотип, характеризующийся, например, удлинённой, веретенообразной морфологией в культуре и низкой скоростью пролиферации (Beamish et al., Tissue Eng Part B Rev (2010) 16(5):467-491; Rzucidlo (2009) Vascular 17(Suppl 1):S15-S20). Сократительный фенотип может быть дополнительно охарактеризован экспрессией, например, миокардина, миозина 11, смузелина, тяжелой цепи гладкомышечного миозина (SMMHC), альфа-гладкомышечного актина ( $\alpha$ SMA), SM22 $\alpha$ , h1-

кальпонины, h-кальдесмона, интегринов  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  и/или дистрофин-гликопротеинового комплекса (DGPC) (Owens et al., *Physiol Rev* (2004) 84(3):767-801, Xie et al., *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2011) 31:1485-1494; Beamish et al., *Tissue Eng Part B Rev* (2010) 16(5):467-491; Rzucidlo (2009) *Vascular* 17(Suppl 1):S15-S20). Специфические клеточные маркеры характеризуют сократительный фенотип СГМК.  $\alpha$ SMA и SM22 $\alpha$  являются ранними маркерами развивающихся ГМК, в то время как кальпонин, кальдесмон и SMMHC являются поздними маркерами<sup>3</sup>.

В ответ на определенные генетические, механические, эндокринные, воспалительные, липидные и нейрогуморальные стимулы может быть вызвано изменение фенотипа сократительных ГМК на «секреторный» фенотип (иногда называемый «синтетическим» или «мигрирующим» фенотипом), характеризующийся повышенной скоростью пролиферации и способностью к миграции, а также экспрессией и/или секрецией провоспалительных факторов и компонентов внеклеточного матрикса (например, коллагена I).

Секреторные ГМК демонстрируют пониженную экспрессию связанных с ГМК генов сократительных белков (например, миокардина, SM22 $\alpha$ , SMMHC) и повышенную экспрессию остеопонтина, I-кальдесмона, тяжелой цепи В немышечного миозина (NM-B MHC), виментина, тропомиозина 4 и клеточного ретинол-связывающего белка-1 (CRBP-1). Секреторные ГМК обладают меньшим количеством актиновых филаментов, повышенным количеством секреторных везикул, увеличенным размером клеток, морфологией в культуре типа «холма и долины» и повышенной экспрессией интегрин  $\alpha 4\beta 1$ .

ГМК, имеющая секреторный фенотип (т. е., секреторная ГМК), в контексте настоящей заявки может характеризоваться одной или более из следующих характеристик: экспрессия одного или более провоспалительных факторов; экспрессия и/или секреция одного или более компонентов внеклеточного матрикса (например, коллагена I); экспрессия и/или секреция IL-11; экспрессия одного или более из остеопонтина, I-кальдесмона, тяжелой цепи В немышечного миозина (NM-B MHC), виментина, тропомиозина 4 и клеточного ретинол-связывающего белка-1 (CRBP-1); секреторные везикулы; морфология в культуре *in vitro* типа «холма и долины»; экспрессия интегрин  $\alpha 4\beta 1$ . В некоторых вариантах реализации секреторная ГМК может характеризоваться одной или более из следующих характеристик, определенных относительно сопоставимой ГМК несекреторного фенотипа (например, сократительной ГМК): повышенная скорость пролиферации; повышенная скорость миграции; повышенная экспрессия одного или более провоспалительных факторов; повышенная экспрессия и/или секреция одного или более компонентов внеклеточного матрикса (например, коллагена I); повышенная экспрессия и/или секреция IL-11; повышенная экспрессия одного или более из остеопонтина, I-кальдесмона, тяжелой цепи В немышечного миозина (NM-B MHC), виментина, тропомиозина 4 и клеточный ретинол-связывающего белка-1 (CRBP-1); повышенное количество секреторных везикул; пониженное количество актиновых филаментов; повышенная экспрессия интегрин  $\alpha 4\beta 1$ ; пониженная экспрессия одного или более сократительных белков (например, миокардина, SM22 $\alpha$ , SMMHC).

- ГМК, имеющая сократительный фенотип (т. е. сократительная ГМК), в контексте настоящей заявки может характеризоваться одной или более из следующих характеристик: экспрессия одного или более из миокардина, миозина 11, смузелина, тяжелой цепи гладкомышечного миозина (SMMHC), альфа-гладкомышечного актина ( $\alpha$ SMA), SM22 $\alpha$ , h1-кальпонина, h-кальдесмона, интегрина  $\alpha$ 1 $\beta$ 1, интегрин  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 и дистрофин-гликопротеинового комплекса (DGPC); актиновые филаменты; и удлинённая веретенообразная морфология в культуре *in vitro*. В некоторых вариантах реализации сократительная ГМК может характеризоваться одной или более из следующих характеристик, определенных относительно сопоставимой ГМК несократительного фенотипа (например, секреторной ГМК): пониженная скорость пролиферации; пониженная скорость миграции; пониженная экспрессия одного или более провоспалительных факторов; пониженная экспрессия и/или секреция одного или более компонентов внеклеточного матрикса (например, коллагена I); пониженная экспрессия и/или секреция IL-11; пониженная экспрессия одного или более из остеопонтина, I-кальдесмона, тяжелой цепи В немышечного миозина (NM-B MHC), виментина, тропомиозина 4 и клеточный ретинол-связывающего белка-1 (CRBP-1); пониженное количество секреторных везикул; повышенное количество актиновых филаментов; пониженная экспрессия интегрин  $\alpha$ 4 $\beta$ 1; и повышенная экспрессия одного или более из миокардина, миозина 11, смузелина, SMMHC, SMMHC,  $\alpha$ SMA, SM22 $\alpha$ , h1-кальпонина, h-кальдесмона, интегрин  $\alpha$ 1 $\beta$ 1, интегрин  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 или дистрофин-гликопротеинового комплекса (DGPC).
- В некоторых вариантах реализации секреторная ГМК может обладать одним или более из: пониженной экспрессии SM22 $\alpha$  по сравнению с сопоставимой ГМК несекреторного фенотипа (например, сократительной ГМК), пониженной экспрессии миокардина по сравнению с сопоставимой ГМК несекреторного фенотипа (например, сократительной ГМК), повышенной экспрессией и/или секрецией коллагена по сравнению с сопоставимой ГМК несекреторного фенотипа (например, сократительной ГМК) или повышенной экспрессией и/или секрецией IL-11 по сравнению с сопоставимой ГМК несекреторного фенотипа (например, сократительной ГМК). В некоторых вариантах реализации секреторная ГМК может демонстрировать одно или более из повышенной пролиферации по сравнению с сопоставимой ГМК несекреторного фенотипа (например, сократительной ГМК), повышенной миграции или повышенной инвазии по сравнению с сопоставимой ГМК несекреторного фенотипа (например, сократительной ГМК).

В контексте настоящей заявки «сопоставимая ГМК» может, например, быть получена из того же органа или ткани, что и ГМК, с которой необходимо провести сравнение.

- В контексте настоящей заявки термин «экспрессия» может представлять собой экспрессию гена или экспрессию белка. Экспрессия гена может быть определена, например, путем детекции мРНК, кодирующей маркер, например, с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР в реальном времени) или методами на основе репортеров. Экспрессия белка может быть определена, например, путем детекции белка, например, методами на основе антител, которые хорошо известны специалисту, такими как вестерн-блоттинг, иммуногистохимия,



иммуноцитохимия, проточная цитометрия и ELISA (иммуноферментный анализ). Экспрессия белка может быть определена методами на основе репортеров, например, анализами функции белка.

5 Проплиферация клеток может быть определена путем анализа деления клеток в течение  
определенного периода времени. Деление клеток может быть проанализировано, например, с  
помощью *in vitro* анализа включения <sup>3</sup>H-тимидина или анализа разведения CFSE, например, как  
описано в источнике Fulcher and Wong, Immunol Cell Biol (1999) 77(6): 559-564, настоящим  
включенном посредством ссылки во всей полноте. Проплиферирующие клетки также могут быть  
10 идентифицированы путем анализа включения 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) с помощью  
подходящего анализа, как описано, например, в источниках Buck et al., Biotechniques. 2008 Jun;  
44(7):927-9, и Sali and Mitchison, PNAS USA 2008 Feb 19; 105(7): 2415–2420, оба из которых  
настоящим включены посредством ссылки во всей полноте.

15 Миграция клеток может быть проанализирована, например, с помощью анализа закрытия раны *in*  
*vitro* методом «царапин», например, как описано в примере 9 и в источнике Liang et al., Nat Protoc.  
(2007) 2(2):329-33, настоящим полностью включенном посредством ссылки во всей полноте.  
Миграция клеток может быть проанализирована с использованием анализов в камере Бойдена,  
как описано в примере 9 и в источнике Chen, Methods Mol Biol. (2005) 294: 15-22, настоящим  
полностью включенным посредством ссылки во всей полноте.

20 Аспекты настоящего изобретения включают ингибирование активности секреторных ГМК. То есть,  
аспекты настоящего изобретения включают в себя ингибирование (т. е. снижение уровня)  
функционального свойства секреторных ГМК.

25 В некоторых вариантах реализации активность секреторных ГМК может представлять собой одно  
или более из: пролиферации, миграции, инвазии, экспрессии и/или секреции одного или более  
компонентов внеклеточного матрикса (например, коллагена I), экспрессии и/или секреции одного  
или более ферментов, модифицирующих матрицу (например, TIMP1), экспрессии и/или секреции  
одного или более провоспалительных цитокинов (например, TNF $\alpha$ ), экспрессии и/или секреции IL-  
30 11 и экспрессии одного или более провоспалительных факторов.

Ингибирование активности секреторных ГМК может быть достигнуто, например, путем  
ингибирования одной или более активностей секреторной ГМК или путем снижения количества  
ГМК.

35 Ингибирование активности секреторных ГМК может быть осуществлено *in vitro* или *in vivo*. В  
некоторых вариантах реализации ингибирование одной или более активностей секреторной ГМК  
осуществляют в ткани, органе или субъекте. В некоторых вариантах реализации снижение  
количества секреторных ГМК может быть осуществлено в ткани, органе или субъекте.

40

### Передача сигналов TGF $\beta$ и IL-11 в ГМК

Роль опосредованной TGF $\beta$  передачи сигналов в переключении фенотипа ГМК неясна. Роль опосредованной IL-11 передачи сигналов в переключении фенотипа ГМК неизвестна.

5 В некоторых экспериментальных моделях было показано, что TGF $\beta$  стимулирует сократительный фенотип СГМК и ингибирует миграцию и пролиферацию СГМК<sup>4</sup>, но в других исследованиях было показано, что TGF $\beta$  имеет решающее значение для миграции ГМК<sup>5</sup>. Специфическое расстройство передачи сигналов TGF $\beta$  при генетических причинах сосудистых аневризм восходящей грудной аорты задокументировано и хорошо описано в литературе (например, синдром Лойса-Дитца (СЛД) из-за мутаций в TGFBR1, TGFBR2, SMAD3 и TGFB2). Существуют свидетельства утраты функции в пути, расположенном выше TGF $\beta$ , при синдроме СЛД и синдрома Марфана, но при парадоксальной активации нижерасположенных эффекторов.

15 Taki et al. *Atherosclerosis* (1999)144(2):375-80 изучили роль передачи сигналов IL-11 в СГМК. Они обнаружили, что TGF $\beta$ , IL-1A и TNF $\alpha$  стимулировали экспрессию генов IL-11 и продукцию белка в СГМК, что, по мнению авторов, имело антиатеросклеротическое действие<sup>5,6</sup>. В другом исследовании СГМК, культивируемые из аорт здорового человека, стимулированных bFGF, показали, что IL-11 вызывал зависимое от концентрации снижение пролиферации СГМК, вызванной bFGF. Ослабление двух цитокинов, зависимых от NF- $\kappa$ B, IL-8 и IL-6, в этой модели было  
20 объяснено вызванным IL-11 подавлением NF- $\kappa$ B<sup>7</sup>.

В экспериментальных примерах настоящего изобретения авторы изобретения обнаружили, что опосредованная TGF $\beta$  передача сигналов и опосредованная IL-11 передача сигналов способны вызывать переключение гладкомышечных клеток с сократительного фенотипа на секреторный  
25 фенотип. Показано, что опосредованная IL-11 передача сигналов является ключевым нижестоящим эффектором опосредованной TGF $\beta$  передачи сигналов, и показано, что специфическое ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов устраняет действия TGF $\beta$ .

### 30 Агенты, способные ингибировать действие IL-11

Аспекты настоящего изобретения включают ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов.

В настоящей заявке термин «ингибирование» относится к уменьшению, снижению или  
35 ослаблению относительно контрольного состояния. Например, ингибирование действия IL-11 агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, относится к уменьшению, снижению или ослаблению величины/степени опосредованной IL-11 передачи сигналов в отсутствие агента, и/или в присутствии соответствующего контрольного агента.

40 Ингибирование может также называться в настоящей заявке нейтрализацией или антагонизмом. То есть агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов (например,

взаимодействие, передачу сигналов или другую активность, опосредованную IL-11 или комплексом, содержащим IL-11), можно назвать «нейтрализующим» или «антагонистическим» агентом относительно соответствующей функции или процесса. Например, агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, может называться агентом, способным  
 5 нейтрализовать опосредованную IL-11 передачу сигналов, или может называться антагонистом опосредованной IL-11 передачи сигналов.

Сигнальный путь IL-11 предлагает множество путей ингибирования передачи сигналов IL-11. Агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, может осуществлять  
 10 это, например, путем ингибирования действия одного или более факторов, участвующих в передаче сигналов посредством рецептора IL-11 или необходимых для нее.

Например, ингибирование передачи сигналов IL-11 может быть достигнуто путем нарушения взаимодействия между IL-11 (или комплексом, содержащим IL-11, например, комплексом IL-11 и  
 15 IL-11R $\alpha$ ) и рецептором IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , рецепторным комплексом, содержащим IL-11R $\alpha$ , gp130, или рецепторным комплексом, содержащим IL-11R $\alpha$  и gp130). В некоторых вариантах реализации ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов достигается путем ингибирования экспрессии гена или белка одного или более из, например, IL-11, IL-11R $\alpha$  и gp130.

В вариантах реализации ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов достигается путем нарушения опосредованной IL-11 *цис*-передачи сигналов, но без нарушения  
 20 опосредованной IL-11 *транс*-передачи сигналов, например, ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов достигается путем ингибирования опосредованных gp130 *цис*-комплексов, содержащих мембранносвязанный IL-11R $\alpha$ . В вариантах реализации ингибирование  
 25 опосредованной IL-11 передачи сигналов достигается путем нарушения опосредованной IL-11 *транс*-передачи сигналов, но без нарушения опосредованной IL-11 *цис*-передачи сигналов, т. е. ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов достигается путем ингибирования комплексов опосредованной gp130 *транс*-передачи сигналов, таких как IL-11, связанный с растворимым IL-11R, или IL-6, связанный с растворимым IL-6R. В вариантах реализации  
 30 ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов достигается путем нарушения опосредованной IL-11 *цис*-передачи сигналов и опосредованной IL-11 *транс*-передачи сигналов. Любой агент, как описано в настоящей заявке, может быть использован для ингибирования опосредованной IL-11 *цис*- и/или *транс*-передачи сигналов.

35 В других примерах ингибирование передачи сигналов IL-11 может быть достигнуто путем нарушения путей передачи сигналов ниже IL-11/IL-11R $\alpha$ /gp130.

В некоторых вариантах реализации в способах согласно настоящему изобретению используются агенты, способные ингибировать передачу сигналов JAK/STAT. В некоторых вариантах  
 40 реализации агенты, способные ингибировать передачу сигналов JAK/STAT, способны ингибировать действие JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B

- и/или STAT6. Например, агенты могут быть способны ингибировать активацию белков JAK/STAT, ингибировать взаимодействие белков JAK или STAT с рецепторами клеточной поверхности, например, IL-11R $\alpha$  или gp130, ингибировать фосфорилирование белков JAK, ингибировать взаимодействие между белками JAK и STAT, ингибировать фосфорилирование белков STAT, ингибировать димеризацию белков STAT, ингибировать транслокацию белков STAT в ядро клетки, ингибировать связывание белков STAT с ДНК и/или способствовать деградации белков JAK и/или STAT. В некоторых вариантах реализации ингибитор JAK/STAT выбран из руксолитиниба (Jakafi/Jakavi; Incyte), тофацитиниба (Xeljanz/Jakvinus; NIH/Pfizer), оклацитиниба (Apoquel), барицитиниба (Olumiant; Incyte/Eli Lilly), филготиниба (G-146034/GLPG-0634; Galapagos NV), гандотиниба (LY-2784544; Eli Lilly), лестауртиниба (CEP-701; Teva), момелотиниба (GS-0387/СУТ-387; Gilead Sciences), пакритиниба (SB1518; CTI), PF-04965842 (Pfizer), упадацитиниба (ABT-494; AbbVie), пефицитиниба (ASP015K/JNJ-54781532; Astellas), федратиниба (SAR302503; Celgene), кукурбитаина I (JSI-124) и CHZ868.
- 15 В некоторых вариантах реализации в способах согласно настоящему изобретению используются агенты, способные ингибировать передачу сигналов MAPK/ERK. В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать передачу сигналов MAPK/ERK, способны ингибировать действие GRB2, ингибировать действие киназы RAF, ингибировать действие белков MEK, ингибировать активацию MAP3K/MAP2K/MAPK и/или Мус, и/или ингибировать
- 20 фосфорилирование белков STAT. В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать передачу сигналов ERK, способны ингибировать p42/44 ERK. В некоторых вариантах реализации ингибитор ERK выбран из SCH772984, SC1, VX-11e и DEL-22379. В вариантах реализации ингибитор ERK выбран из сорафениба (Nexavar; Bayer/Онух), SB590885, PLX4720, XL281, RAF265 (Novartis), энкорафениба (LGX818/Braftovi; Array BioPharma), дабрафениба (Tafinlar;
- 25 GSK), вемурафениба (Zelboraf; Roche), кобиметиниба (Cotellic; Roche), CI-1040, PD0325901, биниметиниба (MEK162/MEKTOVI; Array BioPharma), селуметиниба (AZD6244; Array/AstraZeneca) и траметиниба (GSK1120212/Mekinist; Novartis).

#### Связывающие агенты

- 30 В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, могут связываться с IL-11. В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, могут связываться с рецептором IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R $\alpha$  и/или gp130). Связывание таких агентов может ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов за счет
- 35 снижения/предотвращения способности IL-11 связываться с рецепторами IL-11, тем самым ингибируя нижерасположенную передачу сигналов. Связывание таких агентов может ингибировать опосредованную IL-11 *цис* и/или *транс*-передачу сигналов за счет уменьшения/предотвращения способности IL-11 связываться с рецепторами IL-11, например, IL-11R $\alpha$  и/или gp130, тем самым ингибируя нижерасположенную передачу сигналов. Агенты могут связываться с *транс*-
- 40 сигнальными комплексами, такими как IL-11 и растворимый IL-11R $\alpha$ , и ингибировать опосредованную gp130 передачу сигналов.

Агенты, способные связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, могут быть любого типа, но в некоторых вариантах реализации агент может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, пептид, нуклеиновую кислоту, олигонуклеотид, аптамер или малую молекулу. Агенты могут быть предоставлены в выделенной или очищенной форме или могут быть включены в состав фармацевтической композиции или лекарственного средства.

*Антитела и антигенсвязывающие фрагменты*

В некоторых вариантах реализации агент, способный связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации агент, способный связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, представляет собой полипептид, например, молекулу рецептора-ловушки. В некоторых вариантах реализации агент, способный связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, может представлять собой аптамер.

В некоторых вариантах реализации агент, способный связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. «Антитело» в контексте настоящего изобретения употребляется в самом широком смысле и охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические и полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они демонстрируют связывание с соответствующей молекулой-мишенью.

Принимая во внимание современные методы, относящиеся к технологии моноклональных антител, могут быть получены антитела к большинству антигенов. Антигенсвязывающая часть может представлять собой часть антитела (например, Fab-фрагмент) или синтетический фрагмент антитела (например, одноцепочечный Fv-фрагмент [ScFv]). Моноклональные антитела к выбранным антигенам могут быть получены известными способами, например, способами, описанными в источниках "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) и "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982). Химерные антитела обсуждаются Neuberger et al (1988, 8-й Международный биотехнологический симпозиум, часть 2, 792-799). Моноклональные антитела (mAb) особенно подходят для применения в способах согласно изобретению и представляют собой однородную популяцию антител, специфически нацеленных на один эпитоп на антигене.

Поликлональные антитела также подходят для применения в способах согласно изобретению. Предпочтительными являются моноспецифические поликлональные антитела. Подходящие поликлональные антитела могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники.

Антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как Fab- и Fab<sub>2</sub>-фрагменты, могут быть использованы/предоставлены точно так же, как и генетически сконструированные антитела и фрагменты антител. Варибельные тяжелые (V<sub>H</sub>) и варибельные легкие (V<sub>L</sub>) домены антитела участвуют в распознавании антигена. Этот факт был впервые установлен в ранних экспериментах по расщеплению протеазами. Дальнейшее подтверждение было получено в результате «гуманизации» антител грызунов. Варибельные домены, происходящие от грызунов, могут быть слиты с константными доменами человеческого происхождения, так что полученное в результате антитело сохраняет антигенную специфичность родительского антитела грызунов (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению содержат определяющие комплементарность области (CDR) антитела, способного связываться с соответствующей молекулой-мишенью (т. е. IL-11/комплексом, содержащим IL-11/рецептором IL-11).

Антитела, способные связываться с IL-11, включают, например, моноклональное мышинное антитело против человеческого IL-11, клон №22626; № по каталогу MAB218 (R&D Systems, MN, USA), использованное, например, в Bockhorn et al. Nat. Commun. (2013) 4(0):1393, клон 6D9A (Abbotec), клон KT8 (Abbotec), клон M3103F11 (BioLegend), клон 1F1 (Abnova Corporation), клон 3C6 (Abnova Corporation), клон GF1 (LifeSpan Biosciences), клон 13455 (Source BioScience) и антитела к IL-11, раскрытые в US 2009/0202533 A1, WO 99/59608 A2 и WO 2018/109174 A2.

Антитела, способные связываться с IL-11R $\alpha$ , включают, например, моноклональное антитело, клон 025 (Sino Biological), клон EPR5446 (Abcam), клон 473143 (R & D Systems), клоны 8E2 и 8E4, описанные в US 2014/0219919 A1, моноклональные антитела, описанные в Blanc et al (J. Immunol Methods. 2000 Jul 31;241(1-2):43-59), антитела, раскрытые в WO 2014121325 A1 и US 2013/0302277 A1, и антитела к IL-11R $\alpha$ , раскрытые в US 2009/0202533 A1, WO 99/59608 A2 и WO 2018/109170 A2.

Антитела/фрагменты могут представлять собой антитела-/фрагменты-антагонисты, ингибирующие или снижающие биологическую активность IL-11. Антитела/фрагменты могут представлять собой нейтрализующие антитела, нейтрализующие биологическое действие IL-11, например, его способность стимулировать продуктивную передачу сигналов посредством рецептора IL-11. Нейтрализующая активность может быть измерена по способности нейтрализовать вызванную IL-11 пролиферацию в линии клеток мышинной плазмочитомы T11 (Nordan, R. P. et al. (1987) J. Immunol. 139:813).

Антитела обычно содержат шесть CDR; три в варибельной области легкой цепи (VL): LC-CDR1, LC-CDR2, LC-CDR3, и три в варибельной области тяжелой цепи (VH): HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3. Шесть CDR вместе определяют паратоп антитела - часть антитела, которое связывается с молекулой-мишенью. Существует несколько различных соглашений для определения CDR

антител, например, описанные в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), и VBASE2, как описано в Retter et al., *Nucl. Acids Res.* (2005) 33 (suppl 1): D671-D674.

5

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы и получены с использованием последовательностей моноклональных антител (mAb), способных связываться с соответствующей молекулой-мишенью. Антигенсвязывающие области антител, такие как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab- и Fab<sub>2</sub>-фрагменты, также могут быть использованы/предоставлены. «Антигенсвязывающая область» представляет собой любой фрагмент антитела, способный связываться с мишенью, к которой специфично данное антитело.

10

В некоторых вариантах реализации антитела/фрагменты содержат области VL и VH антитела, способного связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11. Область VL и VH антигенсвязывающей области антитела вместе составляют область Fv. В некоторых вариантах реализации антитела/фрагменты содержат или состоят из области Fv антитела, способного связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11. Область Fv может быть экспрессирована в виде одной цепи, где области VH и VL ковалентно связаны, например, с помощью гибкого олигопептида. Соответственно, антитела/фрагменты могут содержать или состоять из scFv, содержащего области VL и VH антитела, способного связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11.

15

20

Область VL и константная область легкой цепи (CL), а также область VH и константная область 1 тяжелой цепи (CH1) антигенсвязывающей области антитела вместе составляют область Fab. В некоторых вариантах реализации антитела/фрагменты содержат или состоят из области Fab антитела, способного связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11.

25

В некоторых вариантах реализации антитела/фрагменты содержат или состоят из целого антитела, способного связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11. «Целое антитело» относится к антителу, имеющему структуру, по существу схожую со структурой иммуноглобулина (Ig). Различные виды иммуноглобулинов и их структуры описаны, например, в источнике Schroeder and Cavacini *J Allergy Clin Immunol.* (2010) 125(202): S41-S52, настоящим включенном посредством ссылки во всей полноте. Иммуноглобулины типа G (т. е. IgG) представляют собой гликопротеины размером ~ 150 кДа, содержащие две тяжелые цепи и две легкие цепи. От N- к C-концу тяжелые цепи содержат VH, за которым следует константная область тяжелой цепи, содержащая три константных домена (CH1, CH2 и CH3), и аналогично легкая цепь содержит VL, за которой следует CL. В зависимости от тяжелой цепи иммуноглобулины могут быть классифицированы как IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (e.g. IgA1, IgA2), IgD, IgE или IgM. Легкая цепь может представлять собой каппа (κ) или лямбда (λ).

30

35

40

Все из фрагментов антител Fab, Fv, ScFv и dAb могут быть экспрессированы в и секретированы из *E. coli*, что позволяет легко получать большие количества указанных фрагментов.

5 Целые антитела и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты являются «бивалентными». Под «бивалентными» авторы подразумевают, что указанные антитела и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты имеют два антигенсвязывающих сайта. Напротив, фрагменты Fab, Fv, ScFv и dAb являются одновалентными и имеют только один антигенсвязывающий сайт. Синтетические антитела, способные связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, также могут быть получены с использованием технологии фагового дисплея, хорошо известной в данной области техники.

10 Антитела могут быть получены в процессе созревания аффинности, при котором генерируется модифицированное антитело, обладающее улучшенной аффинностью антитела к антигену по сравнению с немодифицированным родительским антителом. Антитела с созревшей аффинностью могут быть получены с помощью методик, известных в данной области техники, например, Marks *et al.*, *Rio/Technology* 10:779-783 (1992); Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):331 0-15 9 (1995); и Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

20 Антитела/фрагменты включают в себя биспецифические антитела, например, состоящие из двух разных фрагментов двух разных антител, так что биспецифическое антитело связывает два типа антигена. Биспецифическое антитело содержит антитело/фрагмент, как описано в настоящей заявке, способные связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11. Антитело может содержать другой фрагмент, имеющий аффинность ко второму антигену, который может представлять собой любой желаемый антиген. Способы получения биспецифических антител хорошо известны в данной области техники, например, см. Mueller, D *et al.*, (2010 *Biodrugs* 24 (2): 89–98), Wozniak-Knopp G *et al.*, (2010 *Protein Eng Des* 23 (4): 289–297. Baeuerle, PA *et al.*, (2009 *Cancer Res* 69 (12): 4941–4944). Биспецифические антитела и биспецифические антигенсвязывающие фрагменты могут быть предоставлены в любом подходящем формате, таком как форматы, описанные в источнике Kontermann MAbs 2012, 4(2): 182-197, настоящим включенном посредством ссылки во всей полноте. Например, биспецифическое антитело или биспецифический антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой конъюгат биспецифического антитела (например, IgG<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> или CovX-Body), биспецифическое IgG или IgG-подобную молекулу (например, IgG, scFv<sub>4</sub>-Ig, IgG-scFv, scFv-IgG, DVD-Ig, IgG-sVD, sVD-IgG, 2 in 1-IgG, mAb<sup>2</sup> или тандемное антитело с общей LC), ассиметричное биспецифическое IgG или IgG-подобную молекулу (например, IgG kih (выступ-во-впадину), IgG kih с общей LC, CrossMab, IgG-scFab kih, mAb-Fv, заряженную пару или SEED-тело), малую молекулу биспецифического антитела (например, диатело (Db), dsDb, DART, scDb, тандемные диатела, тандемный scFv (taFv), тандемное dAb/VHH, триатело, triple head, Fab-scFv или F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>), биспецифический слитый белок Fc и C<sub>H</sub>3 (например, taFv-Fc, Di-диатело, scDb-C<sub>H</sub>3, scFv-Fc-scFv, HCAb-VHH, scFv-kih-Fc или scFv-kih-C<sub>H</sub>3), или биспецифический слитый белок (например, scFv<sub>2</sub>-альбумин, scDb-альбумин,

35

40



taFv-токсин, DNL-Fab<sub>3</sub>, DNL-Fab<sub>4</sub>-IgG, DNL-Fab<sub>4</sub>-IgG-цитокин<sub>2</sub>). См., в частности, фиг. 2 в Kontermann MAb 2012, 4(2): 182-19.

5 Способы получения биспецифических антител включают химическое сшивание антител или фрагментов антител, например, с помощью восстанавливаемых дисульфидных или невосстанавливаемых тиоэфирных связей, например, как описано в источнике Segal and Bast, 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1–2.13.16, настоящим включенном посредством ссылки во всей полноте. Например, *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) может быть использован для химического сшивания, например, 10 Fab-фрагментов через SH-группы шарнирных областей для создания дисульфид-связанных биспецифических F(ab)<sub>2</sub> гетеродимеров.

Другие способы получения биспецифических антител включают слияние гибридом, продуцирующих антитела, например, с помощью полиэтиленгликоля, с получением клетки 15 квадрогибридомы, способной секретировать биспецифические антитела, например, как описано в источнике D. M. and Bast, B. J. 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1–2.13.16.

Биспецифические антитела и биспецифические антигенсвязывающие фрагменты также могут 20 быть получены рекомбинантно путем экспрессии, например, из конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды для антигенсвязывающих молекул, например, как описано в источнике Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition (Humana Press, 2012), в главе 40: Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and Färber-Schwarz), или French, How to make bispecific antibodies, Methods Mol. Med. 2000; 40:333-339.

25 Например, методами молекулярного клонирования может быть получена ДНК-конструкция, кодирующая переменные домены легкой и тяжелой цепи для двух антигенсвязывающих доменов (т. е. переменные домены легкой и тяжелой цепи для антигенсвязывающего домена, способного связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, и 30 переменные домены легкой и тяжелой цепи для антигенсвязывающего домена, способного связываться с другим белком-мишенью), и включающая последовательности, кодирующие подходящий линкер или домен димеризации между антигенсвязывающими доменами. После этого может быть получено рекомбинантное биспецифическое антитело путем экспрессии (например, *in vitro*) указанной конструкции в подходящей клетке-хозяине (например, клетке-хозяине 35 млекопитающего), и затем экспрессированное рекомбинантное биспецифическое антитело может быть необязательно очищено.

#### *Рецепторы-ловушки*

Агенты на основе пептидов или полипептидов, способные связываться с IL-11 или комплексами, 40 содержащими IL-11, могут быть основаны на рецепторе IL-11, например, IL-11-связывающем фрагменте рецептора IL-11.

В некоторых вариантах реализации связывающий агент может содержать IL-11-связывающий фрагмент цепи IL-11R $\alpha$  и предпочтительно может быть растворимым и/или не содержать один или более, или все трансмембранные домены. В некоторых вариантах реализации связывающий агент может содержать IL-11-связывающий фрагмент gp130 и предпочтительно может быть растворимым и/или не содержать один или более, или все трансмембранные домены. Такие молекулы могут быть описаны как рецепторы-ловушки.

Curtis et al (Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12) сообщают, что альфа-цепь растворимого мышинового рецептора IL-11 (sIL-11R) была способна противодействовать активности IL-11 при тестировании на клетках, экспрессирующих трансмембранные IL-11R и gp130. Они предположили, что наблюдаемый антагонизм IL-11 посредством sIL-11R зависит от ограниченных количеств молекул gp130 на клетках, уже экспрессирующих трансмембранный IL-11R.

Об использовании растворимых рецепторов-ловушек в качестве основы для ингибирования передачи сигнала и терапевтического вмешательства также сообщалось для других пар сигнальная молекула:рецептор, например, VEGF и рецептора VEGF (De-Chao Yu et al., Molecular Therapy (2012); 20 5, 938-947; Konner and Dupont Clin Colorectal Cancer 2004 Oct;4 Suppl 2:S81-5).

По существу, в некоторых вариантах реализации связывающий агент может представлять собой рецептор-ловушку, например, растворимый рецептор для IL-11 и/или комплексов, содержащих IL-11. Сообщалось, что конкуренция за IL-11 и/или комплексы, содержащие IL-11, обеспечиваемая рецептором-ловушкой, приводит к антагонистическому действию в отношении IL-11 (см. источник Curtis et al., цитируемый выше). Рецепторы-ловушки IL-11 также описаны в заявках WO 2017/103108 A1 и WO 2018/109168 A1, настоящим полностью включенных посредством ссылки во всей полноте.

Рецепторы-ловушки IL-11 предпочтительно связывают IL-11 и/или комплексы, содержащие IL-11, и тем самым делают эти молекулы недоступными для связывания с рецепторами gp130, IL-11R $\alpha$  и/или gp130:IL-11R $\alpha$ . Как таковые, они действуют как рецепторы-«ловушки» для IL-11 и комплексов, содержащих IL-11, во многом аналогично действию этанерцепта в качестве рецептора-ловушки для TNF $\alpha$ . Опосредованная IL-11 передача сигналов снижается по сравнению с уровнем передачи сигналов в отсутствие рецептора-ловушки.

Рецепторы-ловушки IL-11 предпочтительно связываются с IL-11 посредством одного или нескольких цитокин-связывающих участков (СВМ). СВМ представляют собой или являются производными или гомологами СВМ молекул природных рецепторов IL-11. Например, рецепторы-ловушки IL-11 могут содержать или состоять из одного или более СВМ, которые получены, происходят из или гомологичны СВМ gp130 и/или IL-11R $\alpha$ .

- В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка IL-11 может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей цитокин-связывающему участку gp130. В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка IL-11 может содержать аминокислотную последовательность, соответствующую цитокин-связывающему участку IL-11R $\alpha$ . В настоящей заявке аминокислотная последовательность, «соответствующая» референсной области или последовательности данного пептида/полипептида, обладает по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью аминокислотной последовательности референсной области/последовательности.
- 5
- 10 В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка может быть способен связывать IL-11, например, с аффинностью связывания по меньшей мере 100 мкМ или менее, необязательно 10 мкМ или менее, 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее или приблизительно от 1 до 100 нМ. В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка может содержать весь или часть IL-11-связывающего домена и может необязательно быть лишенным всех или части трансмембранных доменов. Рецептор-ловушка может быть необязательно слит с константной областью иммуноглобулина, например, с областью Fc IgG.
- 15

#### *Ингибиторы*

- Настоящее изобретение предусматривает применение молекул-ингибиторов, способных связываться с одним или более из IL-11, комплекса, содержащего IL-11, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплекса, содержащего IL-11R $\alpha$  и/или gp130, и ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.
- 20

- В некоторых вариантах реализации агент представляет собой связывающие агенты на основе пептида или полипептида на основе IL-11, например, мутант, вариант или связывающий фрагмент IL-11. Подходящие агенты на основе пептидов или полипептидов могут связываться с рецептором IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R $\alpha$  и/или gp130) способом, который не приводит к инициации передачи сигнала, или который приводит к недостаточной передаче сигнала. Мутанты IL-11 этого типа могут действовать в качестве конкурентных ингибиторов эндогенного IL-11.
- 25
- 30

- Например, W147A является антагонистом IL-11, в котором аминокислота 147 мутирована из триптофана в аланин, который разрушает так называемый «сайт III» IL-11. Этот мутант может связываться с IL-11R $\alpha$ , но присоединения гомодимера gp130 не происходит, что приводит к эффективной блокаде передачи сигналов IL-11 (Underhill-Day et al., 2003; Endocrinology 2003 Aug;144(8):3406-14). Lee et al (Am J respire Cell Mol Biol. 2008 Dec; 39(6):739-746) также сообщают о создании мутанта антагониста IL-11 («мутеина»), способного специфически ингибировать связывание IL-11 с IL-11R $\alpha$ . Мутеины IL-11 также описаны в WO 2009/052588 A1.
- 35

Menkhorst et al (Biology of Reproduction May 1, 2009 vol.80 no.5 920-927) описывают пегилированный антагонист IL-11, PEGIL11A (CSL Limited, Парквилл, Виктория, Австралия), эффективный для ингибирования действия IL-11 у самок мышей.

- 5 Pasqualini et al. Cancer (2015) 121(14):2411-2421 описывают лиганд-направленное пептидомиметическое лекарственное средство, нацеленный на метастазы в кости пептидомиметик-11 (BMTP-11), способный связываться с IL-11R $\alpha$ .

10 В некоторых вариантах реализации связывающий агент, способный связываться с рецептором IL-11, может быть предоставлен в форме низкомолекулярного ингибитора одного из IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплекса, содержащего IL-11R $\alpha$  и/или gp130. В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть предоставлен в форме низкомолекулярного ингибитора IL-11 или комплекса, содержащего IL-11, например, ингибитора IL-11, описанного в источнике Lay et al., Int. J. Oncol. (2012); 41(2): 759-764, настоящим полностью включенном посредством ссылки во всей  
15 полноте.

#### *Аптамеры*

В некоторых вариантах реализации агент, способный связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплексом, содержащим  
20 IL-11R $\alpha$  и/или gp130), представляет собой аптамер. Аптамеры, также называемые нуклеиновыми/пептидными лигандами, представляют собой молекулы нуклеиновых кислот или пептидов, характеризующиеся способностью связываться с молекулой-мишенью с высокой специфичностью и высокой аффинностью. Почти каждый аптамер, идентифицированный до  
настоящего времени, является не встречающейся в природе молекулой.

25 Аптамеры для данной мишени (IL-11, комплекс, содержащий IL-11, или рецептор IL-11) могут быть идентифицированы и/или получены методом систематической эволюции лигандов при экспоненциальном обогащении (SELEX<sup>TM</sup>) или путем разработки SOMA-меров (SOMAmers) (модифицированных аптамеров с низкой скоростью диссоциации) (Gold Let al. (2010) PLoS ONE  
30 5(12):e15004). Аптамеры и SELEX описаны в Tuerk and Gold, Science (1990) 249(4968):505-10 и в WO 91/19813. Применение SELEX и технологии SOMAmer включает, например, добавление функциональных групп, имитирующих боковые цепи аминокислот для расширения химического разнообразия аптамера. В результате могут быть обогащены и идентифицированы высокоаффинные аптамеры для мишени.

35 Аптамеры могут представлять собой молекулы ДНК или РНК и могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Аптамер может содержать химически модифицированные нуклеиновые кислоты, например, в которых сахар, и/или фосфат, и/или основание химически модифицированы. Такие модификации могут улучшить стабильность аптамера или сделать аптамер более  
40 устойчивым к деградации, и могут включать модификацию в положении 2' рибозы.

Аптамеры могут быть синтезированы способами, хорошо известными специалисту. Например, аптамеры могут быть синтезированы химически, например, на твердой подложке. В твердофазном синтезе может быть использована фосфорамидитная химия. Вкратце, нуклеотид на твердой подложке детритилируют, затем конденсируют с подходящим образом активированным нуклеозидным фосфорамидитом с образованием фосфитной триэфирной связи. Затем может происходить блокирование с последующим окислением фосфитного триэфира окислителем, обычно иодом. Затем цикл может быть повторен для сборки аптамера (например, см. Sinha, N. D.; Biernat, J.; McManus, J.; Köster, H. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 4539; и Beaucage, S. L.; Lyer, R. P. (1992). *Tetrahedron* 48 (12): 2223).

10 Подходящие аптамеры нуклеиновых кислот могут необязательно иметь минимальную длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов. Подходящие аптамеры нуклеиновых кислот могут необязательно иметь максимальную длину 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 15 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 нуклеотидов. Подходящие аптамеры нуклеиновых кислот могут необязательно иметь длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 20 нуклеотидов.

Аптамеры могут представлять собой пептиды, выбранные или сконструированные для связывания определенных молекул-мишеней. Обзор пептидных аптамеров и способов их получения и идентификации приведен в источнике Reverdatto et al., *Curr Top Med Chem.* (2015) 15(12):1082-101, 25 настоящим включенном посредством ссылки во всей полноте. Пептидные аптамеры могут необязательно иметь минимальную длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. Пептидные аптамеры могут иметь максимальную длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислот. Подходящие пептидные аптамеры могут необязательно иметь длину 2-30, 2-25, 2-20, 5-30, 5-25 30 или 5-20 аминокислот.

Аптамеры могут иметь  $K_d$  в наномолярном или пикомолярном диапазоне, например, менее 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 100 пМ.

### 35 *Свойства IL-11-связывающих агентов*

Агенты, способные связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11 согласно настоящему изобретению, могут обладать одним или более из следующих свойств:

- Специфическое связывание с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11;
- Связывание с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, с  $K_D$  10 мкМ или менее, предпочтительно  $\leq 5$  мкМ,  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ или  $\leq 100$  пМ;

- Ингибирование взаимодействия между IL-11 и IL-11R $\alpha$ ;
- Ингибирование взаимодействия между IL-11 и gp130;
- Ингибирование взаимодействия между IL-11 и рецепторным комплексом IL-11R $\alpha$ :gp130;
- Ингибирование взаимодействия между рецепторным комплексом IL-11:IL-11R $\alpha$  и gp130.

5

Эти свойства могут быть определены путем анализа соответствующего агента в подходящем анализе, который может включать сравнение характеристик агента с подходящими контрольными агентами. Специалист может определить подходящие условия контроля для отдельно взятого анализа.

10

Например, подходящим отрицательным контролем для анализа способности тестируемого антитела/антигенсвязывающего фрагмента связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11/рецептором IL-11 может быть антитело/антиген-связывающее фрагмент, направленные против нецелевого белка (т. е. которые не являются специфичными для IL-11/комплекса, содержащего IL-11/рецептора IL-11). Подходящим положительным контролем может быть известное, подтвержденное (например, коммерчески доступное) антитело, связывающееся с IL-11 или рецептором IL-11. Контроли могут иметь тот же изотип, что и предполагаемые анализируемые антитело/антигенсвязывающий фрагмент, связывающие IL-11/комплекс, содержащий IL-11/рецептор IL-11, и могут, например, иметь такие же константные области.

20

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен специфично связываться с IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R $\alpha$  и/или gp130). Агент, специфически связывающийся с данной молекулой-мишенью, предпочтительно связывает мишень с большей аффинностью и/или с

25

большой продолжительностью, чем он связывается с другими, нецелевыми молекулами.

В некоторых вариантах реализации агент может связываться с IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, с большей аффинностью, чем аффинность связывания с одним или более другими членами семейства цитокинов IL-6 (например, IL-6, лейкоз-ингибирующим фактором (LIF), онкостатином M (OSM), кардиотрофином-1 (CT-1), цилиарным нейротрофическим фактором (CNTF) и кардиотрофин-подобным цитокином (CLC)). В некоторых вариантах реализации агент может связываться с рецептором IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R $\alpha$  и/или gp130) с большей аффинностью, чем аффинность связывания с одним или более другими членами семейства рецепторов IL-6. В некоторых вариантах реализации агент может связываться

35

с IL-11R $\alpha$  с большей аффинностью, чем аффинность связывания с одним или более из IL-6R $\alpha$ , рецептора лейкоз-ингибирующего фактора (LIFR), рецептора онкостатина M (OSMR) и рецептора альфа цилиарного нейротрофического фактора (CNTFR $\alpha$ ).

В некоторых вариантах реализации степень связывания связывающего агента с нецелевым объектом составляет менее чем приблизительно 10% от связывания агента с мишенью, согласно измерениям, например, с помощью ELISA, SPR, биослойной интерферометрии (BLI),

40

микроскопического термофореза (MST) или радиоиммуноанализа (RIA). В качестве альтернативы, специфичность связывания может быть отражена в терминах аффинности связывания, где связывающий агент связывается с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11 с  $K_D$ , составляющей по меньшей мере 0,1 порядка величины (т. е.  $0,1 \times 10^n$ , где  $n$  - целое число, представляющее собой порядок величины) больше, чем  $K_D$  по отношению к другой нецелевой молекуле. Необязательно, она может составлять по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 или 2,0.

Аффинность связывания для данного связывающего агента с его мишенью часто описывают по показателю его константы диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность связывания может быть измерена способами, известными в данной области техники, такими как ELISA, поверхностный плазмонный резонанс (SPR; см., например, Hearty et al., *Methods Mol Biol* (2012) 907:411-442; или Rich et al., *Anal Biochem*. 2008 Feb 1; 373(1):112-20), биослойная интерферометрия (see e.g. Lad et al., (2015) *J Biomol Screen* 20(4): 498-507; или Concepcion et al., *Comb Chem High Throughput Screen*. 2009 Sep; 12(8):791-800), анализ методом микроскопического термофореза (MST) (см., например, Jerabek-Willemsen et al., *Assay Drug Dev Technol*. 2011 Aug; 9(4): 342–353), или анализ связывания радиоактивно меченого антигена (RIA).

В некоторых вариантах реализации агент способен связываться с IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, или с рецептором IL-11 с  $K_D$  50 мкМ или менее, предпочтительно  $\leq 10$  мкМ,  $\leq 5$  мкМ,  $\leq 4$  мкМ,  $\leq 3$  мкМ,  $\leq 2$  мкМ,  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 500$  нМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 75$  нМ,  $\leq 50$  нМ,  $\leq 40$  нМ,  $\leq 30$  нМ,  $\leq 20$  нМ,  $\leq 15$  нМ,  $\leq 12.5$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 9$  нМ,  $\leq 8$  нМ,  $\leq 7$  нМ,  $\leq 6$  нМ,  $\leq 5$  нМ,  $\leq 4$  нМ,  $\leq 3$  нМ,  $\leq 2$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 500$  пМ,  $\leq 400$  пМ,  $\leq 300$  пМ,  $\leq 200$  пМ или  $\leq 100$  пМ.

В некоторых вариантах реализации агент связывается с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11 с аффинностью связывания (например, согласно ELISA)  $EC_{50} = 10000$  нг/мл или менее, предпочтительно  $\leq 5000$  нг/мл,  $\leq 1000$  нг/мл,  $\leq 900$  нг/мл,  $\leq 800$  нг/мл,  $\leq 700$  нг/мл,  $\leq 600$  нг/мл,  $\leq 500$  нг/мл,  $\leq 400$  нг/мл,  $\leq 300$  нг/мл,  $\leq 200$  нг/мл,  $\leq 100$  нг/мл,  $\leq 90$  нг/мл,  $\leq 80$  нг/мл,  $\leq 70$  нг/мл,  $\leq 60$  нг/мл,  $\leq 50$  нг/мл,  $\leq 40$  нг/мл,  $\leq 30$  нг/мл,  $\leq 20$  нг/мл,  $\leq 15$  нг/мл,  $\leq 10$  нг/мл,  $\leq 7,5$  нг/мл,  $\leq 5$  нг/мл,  $\leq 2,5$  нг/мл или  $\leq 1$  нг/мл. Такие ELISA могут быть проведены, например, как описано в *Antibody Engineering*, vol. 1 (2<sup>nd</sup> Edn), Springer Protocols, Springer (2010), Part V, pp657-665.

В некоторых вариантах реализации агент связывается с IL-11 или IL-11-содержащим комплексом в области, важной для связывания с рецептором IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, например, gp130 или IL-11R $\alpha$ , и тем самым ингибирует взаимодействие между IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, и рецептором IL-11, и/или передачу сигналов посредством рецептора. В некоторых вариантах реализации агент связывается с рецептором IL-11 в области, важной для связывания с IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, и тем самым ингибирует взаимодействие между IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, и рецептором IL-11, и/или передачу сигналов посредством рецептора.

Способность данного связывающего агента (например, агента, способного связывать IL-11/комплекс, содержащий IL-11, или рецептор IL-11) ингибировать взаимодействие между двумя белками может быть определена, например, анализом взаимодействия в присутствии связывающего агента или после инкубации одного или обоих партнеров по взаимодействию со связывающим агентом. Примером подходящего анализа для определения того, способен ли отдельно взятый связывающий агент ингибировать взаимодействие между двумя партнерами по взаимодействию, является конкурентный ELISA.

Связывающий агент, способный ингибировать отдельно взятое взаимодействие (например, между IL-11 и IL-11R $\alpha$ , или между IL-11 и gp130, или между IL-11 и IL-11R $\alpha$ :gp130, или между IL-11:IL-11R $\alpha$  и gp130) идентифицируют по наблюдению уменьшения/снижения уровня взаимодействия между партнерами по взаимодействию в присутствии связывающего агента или после инкубации одного или обоих партнеров по взаимодействию со связывающим агентом по сравнению с уровнем взаимодействия в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента). Подходящий анализ может быть проведен *in vitro*, например, с использованием рекомбинантных партнеров по взаимодействию или с использованием клеток, экспрессирующих партнеров по взаимодействию. Клетки, экспрессирующие партнеров по взаимодействию, могут делать это эндогенно или могут делать это из нуклеиновой кислоты, введенной в клетку. Для целей таких анализов один или оба из партнеров по взаимодействию и/или связывающий агент могут быть помечены или использованы в сочетании с детектируемым объектом для целей обнаружения и/или измерения уровня взаимодействия. Например, агент может быть помечен радиоактивным атомом или окрашенной молекулой, или флуоресцентной молекулой, или молекулой, которую можно легко обнаружить любым другим способом. Подходящие детектируемые молекулы включают флуоресцентные белки, люциферазу, ферментные субстраты и радиоактивные метки. Связывающий агент может быть непосредственно помечен детектируемой меткой или может быть помечен опосредованно. Например, связывающий агент может быть не мечен и обнаружен с помощью другого, меченого связывающего агента. В качестве альтернативы, второй связывающий агент может быть связан с биотином, и связывание меченого стрептавидина с биотином может быть использовано для опосредованного мечения первого связывающего агента.

Способность связывающего агента ингибировать взаимодействие между двумя партнерами по связыванию также может быть определена путем анализа нижерасположенных функциональных последствий такого взаимодействия, например опосредованной IL-11 передачи сигналов. Например, нижерасположенные функциональные последствия взаимодействия между IL-11 и IL-11R $\alpha$ :gp130 или между IL-11:IL-11R $\alpha$  и gp130 могут включать, например, процесс, опосредованный IL-11, образование миофибробластов из фибробластов, пролиферацию или миграцию секреторными ГМК, или экспрессия генов/белков, например, коллагена или IL-11.

Способность связывающего агента ингибировать взаимодействие между IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, и рецептором IL-11 может, например, быть проанализирована путем



стимуляции фибробластов с помощью TGF $\beta$ 1, инкубирования клеток в присутствии связывающего агента и анализа доли клеток, имеющих  $\alpha$ SMA-положительный фенотип, по прошествии определенного периода времени. В таких примерах ингибирование взаимодействия между IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, и рецептором IL-11 может быть идентифицировано при наблюдении меньшей доли клеток, имеющих  $\alpha$ SMA-положительный фенотип, по сравнению с условиями положительного контроля, в которых клетки обрабатывают TGF $\beta$ 1 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента) или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента. Такие анализы также подходят для анализа способности связывающего агента ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов. Ингибирование взаимодействия между IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, и рецептором IL-11 также может быть проанализировано с помощью анализов включения  $^3$ H-тимидина и/или анализов пролиферации клеток Ba/F3, таких как описанные, например, в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) и Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80. Клетки Ba/F3 совместно экспрессируют IL-11R $\alpha$  и gp130.

В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11R $\alpha$  до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11R $\alpha$  в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента). В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11R $\alpha$  до менее чем 1 раза, например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11R $\alpha$  в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента).

В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и gp130 до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня взаимодействия между IL-11 и gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента). В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и gp130 до менее чем 1 раза, например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня взаимодействия между IL-11 и gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента).

В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11R $\alpha$ :gp130 до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11R $\alpha$ :gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента). В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11R $\alpha$ :gp130 до менее чем 1 раза, например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11R $\alpha$ :gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента).

В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между комплексом IL-11:IL-11R $\alpha$  и gp130 до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня взаимодействия между комплексом IL-11:IL-11R $\alpha$  и gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного связывающего агента). В некоторых вариантах реализации связывающий агент способен ингибировать взаимодействие между комплексом IL-11:IL-11R $\alpha$  и gp130 до менее чем 1 раза, например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня взаимодействия между комплексом IL-11:IL-11R $\alpha$  и gp130 в отсутствие связывающего агента.

#### Агенты, способные снижать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11

В аспектах настоящего изобретения может быть предложен агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, способный предотвращать или снижать экспрессию одного или более из IL-11, IL-11R или gp130.

Экспрессия может представлять собой экспрессию гена или белка и может быть определена, как описано в настоящей заявке. Экспрессия может осуществляться клеткой/тканью/органом/системой органов субъекта. Например, экспрессия может быть предотвращена/снижена в гладкомышечных клетках.

Подходящие агенты могут быть любого типа, но в некоторых вариантах реализации агент, способный предотвращать или снижать экспрессию одного или более из IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, может представлять собой малую молекулу или олигонуклеотид.

Агент, способный предотвращать или снижать экспрессию одного или более из IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, может осуществлять это, например, посредством ингибирования транскрипции гена, кодирующего IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, ингибирования посттранскрипционного процессинга РНК, кодирующей IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, снижения стабильности РНК, кодирующей IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, способствования деградации РНК, кодирующей IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, ингибирования посттрансляционного процессинга полипептида IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, снижения стабильности полипептида IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130 или способствования деградации полипептида IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130.

10 Taki et al. Clin Exp Immunol (1998) Apr; 112(1): 133-138 сообщили о снижении экспрессии IL-11 в клетках ревматоидной синовиальной оболочки после лечения индометацином, дексаметазоном или интерфероном-гамма (IFN $\gamma$ ).

15 Настоящее изобретение предусматривает применение антисмысловой нуклеиновой кислоты для предотвращения/снижения экспрессии IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130. В некоторых вариантах реализации агент, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, может вызывать снижение экспрессии посредством РНК-интерференции (RNAi).

20 В некоторых вариантах реализации агент может представлять собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, такую как антисмысловая или малая интерферирующая РНК, включая, не ограничиваясь перечисленным, мшРНК (малую шпилечную РНК) или миРНК.

25 В некоторых вариантах реализации ингибирующая нуклеиновая кислота представлена в векторе. Например, в некоторых вариантах реализации агент может представлять собой лентивирусный вектор, кодирующий мшРНК для одного или более из IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130.

30 Для регуляции экспрессии генов могут быть использованы молекулы олигонуклеотидов, в частности, РНК. К ним относятся антисмысловые олигонуклеотиды, целенаправленная деградация мРНК с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК), посттранскрипционный сайленсинг генов (PTG), регулируемое развитием сиквенс-специфичное подавление трансляции мРНК с помощью микроРНК (мкРНК) и направленный транскрипционный сайленсинг генов.

35 Антисмысловой олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид, предпочтительно одноцепочечный, который нацеливается и связывается путем связывания комплементарной последовательности с олигонуклеотидом-мишенью, например, мРНК. Если олигонуклеотид-мишень представляет собой мРНК, связывание антисмысловой последовательности с мРНК блокирует трансляцию мРНК и экспрессию продукта гена. Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть сконструированы с возможностью связывания смысловой геномной нуклеиновой кислоты и ингибирования транскрипции нуклеотидной последовательности-мишени.

Так как последовательности нуклеиновых кислот для IL-11, IL-11R $\alpha$  и gp130 известны (например, известных последовательностей мРНК, доступных в GenBank под номерами доступа: BC012506.1 GI:15341754 (человеческий IL-11), BC134354.1 GI:126632002 (мышинный IL-11), AF347935.1 GI:13549072 (крысиный IL-11), NM\_001142784.2 GI:391353394 (человеческий IL-11R $\alpha$ ),

5 NM\_001163401.1 GI:254281268 (мышинный IL-11R $\alpha$ ), NM\_139116.1 GI:20806172 (крысиный IL-11R $\alpha$ ), NM\_001190981.1 GI:300244534 (человеческий gp130), NM\_010560.3 GI:225007624 (мышинный gp130), NM\_001008725.3 GI:300244570 (крысиный gp130)), олигонуклеотиды могут быть сконструированы с возможностью подавления или сайленсинга экспрессии IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130.

10 Такие олигонуклеотиды могут иметь любую длину, но предпочтительно могут быть короткими, например, менее 100 нуклеотидов, например, 10-40 нуклеотидов или 20-50 нуклеотидов, и могут содержать нуклеотидную последовательность, обладающую полной или почти

15 комплементарностью (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% комплементарностью) последовательности нуклеотидов соответствующей длины в олигонуклеотиде-мишени, например, мРНК IL-11, IL-11R или gp130. Комплементарная область нуклеотидной последовательности может иметь любую длину, но предпочтительно имеет по

20 меньшей мере 5 и, необязательно, не более 50 нуклеотидов в длину, например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов.

Подавление экспрессии IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130 предпочтительно будет приводить к снижению количества IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, экспрессируемого клеткой/тканью/органом/системой органов/субъектом. Например, в отдельно взятой клетке подавление IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130

25 путем введения подходящей нуклеиновой кислоты приведет к уменьшению количества IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, экспрессируемого этой клеткой, относительно необработанной клетки. Подавление может быть частичным. Предпочтительные степени подавления составляют по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85% или 90%. Уровень подавления от 90% до 100% считается «сайленсингом» экспрессии или функции.

30 Была продемонстрирована роль механизма РНКи и малых РНК в нацеливании на гетерохроматиновые комплексы и эпигенетический сайленсинг генов в определенных хромосомных локусах. Зависимый от двухцепочечной РНК (дцРНК) посттранскрипционный сайленсинг, также известный как РНК-интерференция (РНКи), представляет собой явление, при

35 котором комплексы дцРНК могут нацеливаться на определенные гомологичные гены для сайленсинга в течение короткого периода времени. Он действует как сигнал к индукции деградации мРНК, обладающей идентичностью последовательности. 20-нуклеотидные миРНК, как правило, имеют достаточную длину, чтобы вызвать ген-специфический сайленсинг, но являются достаточно короткими, чтобы избежать ответа хозяина. Снижение экспрессии продуктов генов-

40 мишеней может быть значительным при 90% сайленсинге, вызванном несколькими молекулами

миРНК. Терапия на основе РНК прошла клинические испытания I, II и III фазы по ряду показаний (Nature 2009 Jan 22; 457(7228):426-433).

- 5 В данной области техники эти последовательности РНК называют «короткими или малыми интерферирующими РНК» (миРНК) или «микроРНК» (мкРНК) в зависимости от их происхождения. Оба типа последовательностей могут быть использованы для подавления экспрессии генов путем связывания с комплементарными РНК и либо инициации удаления мРНК (РНКи), либо остановки трансляции мРНК в белок. миРНК получают путем процессинга длинных двухцепочечных РНК, и встречающиеся в природе миРНК обычно имеют экзогенное происхождение.
- 10 Микроинтерферирующие РНК (мкРНК) представляют собой эндогенно кодируемые малые некодирующие РНК, полученные путем процессинга коротких шпилек. Как миРНК, так и мкРНК могут ингибировать трансляцию мРНК, несущих частично комплементарные последовательности-мишени, без расщепления РНК, и разрушать мРНК, несущие полностью комплементарные последовательности.
- 15 Лиганды миРНК, как правило, являются двухцепочечными, и для оптимизации эффективности опосредованного РНК подавления функции гена-мишени предпочтительно, чтобы длина молекулы миРНК была выбрана для обеспечения правильного распознавания миРНК комплексом RISC, который опосредует распознавание миРНК мишени мРНК, и чтобы миРНК была достаточно
- 20 короткой, чтобы уменьшить ответ хозяина.
- Лиганды мкРНК обычно являются одноцепочечными и имеют области, которые являются частично комплементарными, что позволяет лигандам образовывать шпильку. мкРНК представляют собой гены РНК, которые транскрибируются с ДНК, но не транслируются в белок. Последовательность
- 25 ДНК, кодирующая ген мкРНК, длиннее, чем мкРНК. Эта последовательность ДНК включает последовательность мкРНК и приблизительный обратный комплемент. Когда эта последовательность ДНК транскрибируется в молекулу одноцепочечной РНК, последовательность мкРНК и основания ее обратного комплемента спариваются с образованием частично двухцепочечного сегмента РНК. Конструирование последовательностей микроРНК обсуждается в
- 30 источнике John et al, PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004.
- Как правило, лиганды РНК, предназначенные для имитации действий миРНК или мкРНК, имеют от 10 до 40 рибонуклеотидов (или их синтетических аналогов), более предпочтительно от 17 до 30 рибонуклеотидов, более предпочтительно от 19 до 25 рибонуклеотидов и наиболее
- 35 предпочтительно от 21 до 23 рибонуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения, где используется двухцепочечная миРНК, молекула может иметь симметричные 3'-липкие концы, например, один или два (рибо)нуклеотида, обычно UU dTdT 3'-липкий конец. На основании приведенного в настоящей заявке описания специалист может легко разработать подходящие последовательности миРНК и мкРНК, например, используя такие ресурсы, как Ambion siRNA finder.
- 40 Последовательности миРНК и мкРНК могут быть получены синтетически и добавлены экзогенно,

чтобы вызвать подавление гена, или получены с использованием систем экспрессии (например, векторов). В предпочтительном варианте реализации миРНК синтезируют синтетически.

5 Более длинные двухцепочечные РНК могут быть подвергнуты процессингу в клетке с получением миРНК (см., например, Myers (2003) *Nature Biotechnology* 21:324-328). Более длинная молекула дцРНК может иметь симметричные 3'- или 5'-липкие концы, например, из одного или двух (рибо)нуклеотидов, или может иметь тупые концы. Более длинные молекулы дцРНК могут состоять из 25 нуклеотидов или более. Предпочтительно более длинные молекулы дцРНК имеют длину от 25 до 30 нуклеотидов. Более предпочтительно, более длинные молекулы дцРНК имеют длину от 25 до 27 нуклеотидов. Наиболее предпочтительно более длинные молекулы дцРНК имеют длину 27 нуклеотидов. дцРНК длиной 30 или более нуклеотидов могут быть экспрессированы с использованием вектора pDECAP (Shinagawa et al., *Genes and Dev.*, 17, 1340-5, 2003).

15 Другой альтернативой является экспрессия молекулы малой шпилечной РНК (мшРНК) в клетке. мшРНК более стабильны, чем синтетические миРНК. мшРНК состоит из коротких инвертированных повторов, разделенных короткой последовательностью петли. Один инвертированный повтор комплементарен гену-мишени. В клетке мшРНК подвергается процессингу DICER в миРНК, которая разрушает мРНК гена-мишени и подавляет экспрессию. В предпочтительном варианте реализации кшРНК продуцируют эндогенно (внутри клетки) путем транскрипции из вектора. кшРНК могут быть получены внутри клетки путем трансфекции клетки вектором, кодирующим последовательность кшРНК, под контролем промотора РНК-полимеразы III, такого как промотор H1 или 7SK человека или промотор РНК-полимеразы II. В качестве альтернативы, кшРНК может быть синтезирована экзогенно (*in vitro*) путем транскрипции из вектора. Затем кшРНК может быть введена непосредственно в клетку. Предпочтительно молекула кшРНК содержит частичную последовательность IL-11, IL-11R или gp130. Предпочтительно последовательность кшРНК имеет длину от 40 до 100 оснований, более предпочтительно от 40 до 70 оснований. Длина стебля шпильки предпочтительно составляет от 19 до 30 пар оснований в длину. Стебель может содержать пары G-U для стабилизации шпилечной структуры.

30 Молекулы миРНК, более длинные молекулы дцРНК или молекулы мкРНК могут быть получены рекомбинантно путем транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, предпочтительно содержащейся в векторе. Предпочтительно молекула миРНК, более длинная молекула дцРНК или молекула мкРНК содержат частичную последовательность IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130.

35 В одном из вариантов реализации миРНК, более длинная дцРНК или мкРНК продуцируются эндогенно (внутри клетки) путем транскрипции из вектора. Вектор может быть введен в клетку любым из способов, известных в данной области техники. Необязательно, экспрессия последовательности РНК может регулироваться с использованием тканеспецифического промотора (например, специфичного для сердца, печени, почек или глаз). В дополнительном

40

варианте реализации миРНК, более длинная дцРНК или мкРНК продуцируются экзогенно (*in vitro*) путем транскрипции из вектора.

5 Подходящими векторами могут быть олигонуклеотидные векторы, разработанные с возможностью экспрессии олигонуклеотидного агента, способного к подавлению IL-11, IL-11R или gp130. Такие векторы могут представлять собой вирусные векторы или плазмидные векторы. Терапевтический олигонуклеотид может быть включен в геном вирусного вектора и функционально связан с регуляторной последовательностью, например, промотором, управляющей его экспрессией. Термин «функционально связанный» может включать ситуацию, в которой выбранная нуклеотидная последовательность и регуляторная нуклеотидная последовательность ковалентно связаны таким образом, чтобы поместить экспрессию нуклеотидной последовательности под влияние или контроль указанной регуляторной последовательности. Таким образом, регуляторная последовательность функционально связана с выбранной нуклеотидной последовательностью, если указанная регуляторная последовательность способна осуществлять транскрипцию нуклеотидной последовательности, которая образует часть или всю указанную выбранную нуклеотидную последовательность.

10

15

Вирусные векторы, кодирующие экспрессируемые промотором последовательности миРНК, известны в данной области техники и обладают преимуществом долгосрочной экспрессии терапевтического олигонуклеотида. Примеры включают лентивирус (Nature 2009 Jan 22; 457(7228):426-433), аденовирус (Shen et al., FEBS Lett 2003 Mar 27;539(1-3)111-4) и ретровирусы (Barton and Medzhitov PNAS November 12, 2002 vol.99, no.23 14943-14945).

20

В других вариантах реализации вектор может быть разработан для способствования доставке терапевтического олигонуклеотида в сайт, в котором требуется подавление экспрессии IL-11, IL-11R или gp130. Такие векторы обычно включают образование комплекса олигонуклеотида с положительно заряженным вектором (например, катионные пептиды, проникающие в клетки, катионные полимеры и дендримеры и катионные липиды); конъюгирование олигонуклеотида с малыми молекулами (например, холестерин, желчными кислотами и липидами), полимерами, антителами и РНК; или инкапсулирование олигонуклеотида в препаратах наночастиц (Wang et al., AAPS J. 2010 Dec; 12(4): 492-503).

25

30

В одном из вариантов реализации вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты как в смысловой, так и в антисмысловой ориентации, так что при экспрессии в виде РНК смысловые и антисмысловые участки будут ассоциировать с образованием двухцепочечной РНК.

35

В качестве альтернативы, молекулы миРНК могут быть синтезированы с использованием стандартных методик твердофазного или жидкофазного синтеза, известных в данной области техники. Связи между нуклеотидами могут представлять собой фосфодиэфирные связи или альтернативы, например, связывающие группы формулы P(O)S, (тиозэфир); P(S)S, (дитиозэфир); P(O)NR'<sup>2</sup>; P(O)R'; P(O)OR<sub>6</sub>; CO; или CONR'<sup>2</sup>, где R представляет собой H (или соль) или алкил (1-

40

12С), а R6 представляет собой алкил (1-9С), присоединенный к соседним нуклеотидам через -О- или -S-.

5 Модифицированные нуклеотидные основания могут быть использованы в дополнение к встречающимся в природе основаниям и могут придавать выгодные свойства содержащим их молекулам миРНК.

10 Например, модифицированные основания могут повышать стабильность молекулы миРНК, тем самым уменьшая количество, необходимое для сайленсинга. Включение модифицированных оснований также может обеспечить молекулы миРНК, которые являются более или менее стабильными, чем немодифицированные миРНК.

15 Термин «модифицированное нуклеотидное основание» охватывает нуклеотиды с ковалентно модифицированным основанием и/или сахаром. Например, модифицированные нуклеотиды включают нуклеотиды, содержащие сахара, ковалентно связанные с низкомолекулярными органическими группами, отличными от гидроксильной группы в 3'-положении и отличными от фосфатной группы в 5'-положении. Таким образом, модифицированные нуклеотиды могут также включать 2-замещенные сахара, такие как 2'-О-метил-; 2'-О-алкил; 2'-О-аллил; 2'-S-алкил; 2'-S-аллил; 2'-фтор-; 2'-галоген или азидорибоза, карбоциклические аналоги сахара, α-аномерные сахара; эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара и седогептулоза.

20

Модифицированные нуклеотиды известны в данной области техники и включают алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины и пиримидины и другие гетероциклы. Эти классы пиримидинов и пуринов известны в данной области техники и включают в себя псевдоизоцитозин, N4,N4-этанцитозин, 8-гидрокси-N6-метиладенин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-фторурацил, 5-бромуррацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, инозин, N6-изопентиладенин, 1-метиладенин, 1-метилпсевдоурацил, 1-метилгуанин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-метиладенин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, -D-маннозилквеуозин, 5-метоксикарбонилметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, псевдоурацил, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир N-урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил 5-оксиуксусная кислота, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-пропилурацил, 5-пропилцитозин, 5-этилурацил, 5-этилцитозин, 5-бутилурацил, 5-пентилурацил, 5-пентилцитозин и 2,6-диаминопурин, метилпсевдоурацил, 1-метилгуанин, 1-метилцитозин.

30

35

40 В данной области техники известны способы, относящиеся к применению РНКи для сайленсинга генов у *C. elegans*, *Drosophila*, растений и млекопитающих (Fire A, et al., 1998 Nature 391:806-811; Fire, A. Trends Genet. 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. RNA interference 2001. Genes Dev. 15, 485-490



(2001); Hammond, S. M., et al., Nature Rev. Genet. 2, 110-1119 (2001); Tuschl, T. Chem. Biochem. 2, 239-245 (2001); Hamilton, A. et al., Science 286, 950-952 (1999); Hammond, S. M., et al., Nature 404, 293-296 (2000); Zamore, P. D., et al., Cell 101, 25-33 (2000); Bernstein, E., et al., Nature 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M., et al., Genes Dev. 15, 188-200 (2001); WO0129058; WO9932619, и Elbashir S M, et al., 2001 Nature 411:494-498).

Соответственно, изобретение относится к нуклеиновой кислоте, способной при надлежащем введении в клетку млекопитающего, например человека, которая в противном случае экспрессирует IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, или экспрессии в ней, подавлять экспрессию IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130 посредством РНКи.

Последовательности нуклеиновых кислот для IL-11, IL-11R $\alpha$  и gp130 (например, известные последовательности мРНК, доступные в GenBank под номерами доступа: BC012506.1 GI:15341754 (человеческий IL-11), BC134354.1 GI:126632002 (мышинный IL-11), AF347935.1 GI:13549072 (крысиный IL-11), NM\_001142784.2 GI:391353394 (человеческий IL-11R $\alpha$ ), NM\_001163401.1 GI:254281268 (мышинный IL-11R $\alpha$ ), NM\_139116.1 GI:20806172 (крысиный IL-11R $\alpha$ ), NM\_001190981.1 GI:300244534 (человеческий gp130), NM\_010560.3 GI:225007624 (мышинный gp130), NM\_001008725.3 GI:300244570 (крысиный gp130)), олигонуклеотиды могут быть сконструированы с возможностью подавления или сайленсинга экспрессии IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130.

Нуклеиновая кислота может обладать существенной последовательности части мРНК IL-11, IL-11R или gp130, например, как определено под номерами доступа GenBank NM\_000641.3 GI:391353405 (IL-11), NM\_001142784.2 GI:391353394 (IL-11R $\alpha$ ), NM\_001190981.1 GI:300244534 (gp130), или последовательности, комплементарной указанной мРНК.

Нуклеиновая кислота может представлять собой двухцепочечную миРНК. (Как будет понятно специалисту, и как поясняется ниже, молекула миРНК может также включать короткую 3'-последовательность ДНК.)

В качестве альтернативы, нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК (обычно двухцепочечную ДНК), которая при транскрипции в клетке млекопитающего дает РНК, имеющую две комплементарные части, соединенные спейсером, так что РНК принимает форму шпильки, когда комплементарные части гибридизуются друг с другом. В клетке млекопитающего шпильчатая структура может быть отщеплена от молекулы ферментом DICER с получением двух разных, но гибридизованных молекул РНК.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации нуклеиновая кислота обычно нацелена на последовательность с одной из SEQ ID NO: 6-9 (IL-11) или на одну из SEQ ID NO: 10-13 (IL-11R $\alpha$ ).

Ожидается, что только одноцепочечные (т. е. не самогибридизирующиеся) области транскрипта мРНК будут подходящими мишенями для РНКи. Поэтому предполагается, что другие

последовательности, очень близкие по транскрипту мРНК IL-11 или IL-11R $\alpha$  к последовательности, представленной одной из SEQ ID NO: 6-9 или 10-13, также могут быть подходящими мишенями для РНКи. Такие последовательности-мишени предпочтительно имеют длину 17-23 нуклеотида и предпочтительно перекрываются с одной из SEQ ID NO: 6-9 или 10-13 по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или все 19 нуклеотидов (на любом конце одной из SEQ ID NO: 6-9 или 10-13).

Соответственно, изобретение относится к нуклеиновой кислоте, способной, когда она подходящим образом введена в клетку млекопитающего, которая в противном случае экспрессирует IL-11 или IL-11R $\alpha$ , или экспрессирована в ней, подавлять экспрессию IL-11 или IL-11R $\alpha$  посредством РНКи, где нуклеиновая кислота обычно нацелена на последовательность одной из SEQ ID NO: 6-9 или 10-13.

Под «обычно нацеленной» подразумевается, что нуклеиновая кислота может быть нацелена на последовательность, которая перекрывается с SEQ ID NO: 6-9 или 10-13. В частности, нуклеиновая кислота может быть нацелена на последовательность в мРНК человеческого IL-11 или IL-11R, которая немного длиннее или короче, чем одна из SEQ ID NO: 6-9 или 10-13 (предпочтительно длиной 17-23 нуклеотида), но в остальном идентична одной из SEQ ID NO: 6-9 или 10-13.

Ожидается, что идеальная идентичность/комплементарность между нуклеиновой кислотой согласно изобретению и последовательностью-мишенью, хотя и является предпочтительной, не является существенной. Соответственно, нуклеиновая кислота согласно изобретению может включать одно несовпадение с мРНК IL-11 или IL-11R. Однако ожидается, что наличие даже одного несовпадения может привести к снижению эффективности, поэтому предпочтение отдается отсутствию несовпадений. 3'-липкие концы, когда они присутствуют, могут быть исключены из рассмотрения количества несовпадений.

Термин «комплементарность» не ограничивается обычным спариванием оснований между нуклеиновой кислотой, состоящей из встречающихся в природе рибо- и/или дезоксирибонуклеотидов, но также включает спаривание оснований между мРНК и нуклеиновыми кислотами согласно изобретению, которые включают неприродные нуклеотиды.

В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота (называемая в настоящей заявке двухцепочечной миРНК) включает последовательности двухцепочечной РНК, представленные в SEQ ID NO: 14-17. В еще одном варианте реализации нуклеиновая кислота (называемая в настоящей заявке двухцепочечной миРНК) включает последовательности двухцепочечной РНК, представленные в SEQ ID NO: 18-21.

Однако также ожидается, что несколько более короткие или более длинные последовательности, направленные в одну и ту же область мРНК IL-11 или IL-11R $\alpha$ , также будут эффективными. В

частности, ожидается, что двухцепочечные последовательности длиной от 17 до 23 п. н. также будут эффективными.

- 5 Нити, образующие двухцепочечную РНК, могут иметь короткие 3'-динуклеотидные липкие концы, которые могут представлять собой ДНК или РНК. Использование 3'-липкого конца ДНК не влияет на активность миРНК по сравнению с 3'-липким концом РНК, но снижает стоимость химического синтеза цепей нуклеиновой кислоты (Elbashir et al., 2001c). По этой причине динуклеотиды ДНК могут быть предпочтительными.
- 10 Динуклеотидные липкие концы, когда они присутствуют, могут быть симметричны друг другу, хотя это не является обязательным. И действительно, 3'-липкий конец смысловой (верхней) цепи не влияет на активность РНКи, так как он не участвует в распознавании и деградации мРНК (Elbashir et al., 2001a, 2001b, 2001c).
- 15 Хотя эксперименты с РНКи на *Drosophila* показывают, что антисмысловые 3'-липкие концы могут участвовать в распознавании и нацеливании мРНК (Elbashir et al. 2001c), 3'-липкие концы, по видимому не являются необходимыми для активности РНКи миРНК в клетках млекопитающих. Поэтому считается, что неправильный отжиг 3'-липких концов оказывает незначительное влияние на клетки млекопитающих (Elbashir et al. 2001c; Czauderna et al. 2003).
- 20 Поэтому в антисмысловой цепи миРНК может быть использован любой динуклеотидный липкий конец. Тем не менее, динуклеотид предпочтительно представляет собой -UU или -UG (или -TT или -TG, если липкий конец представляет собой ДНК), более предпочтительно -UU (или -TT). Динуклеотидный липкий конец -UU (или -TT) наиболее эффективен и согласуется с (т. е. способен
- 25 образовывать часть) сигналом терминации транскрипции РНК-полимеразой III (сигнал терминатора представляет собой TTTTT). Соответственно, этот динуклеотид является наиболее предпочтительным. Динуклеотиды AA, CC и GG также могут быть использованы, но они менее эффективны и, следовательно, менее предпочтительны.
- 30 Более того, 3'-липкие концы могут быть полностью исключены из миРНК.
- Изобретение также относится к одноцепочечным нуклеиновым кислотам (называемым в настоящей заявке одноцепочечными миРНК), соответствующим состоящим из цепи-компонента одной из вышеупомянутых двухцепочечных нуклеиновых кислот, предпочтительно с 3'-липкими
- 35 концами, но необязательно без них. Изобретение также относится к наборам, содержащим пары таких одноцепочечных нуклеиновых кислот, которые способны гибридизоваться друг с другом *in vitro* с образованием вышеупомянутых двухцепочечных миРНК, которые затем могут быть введены в клетки.
- 40 Изобретение также относится к ДНК, которая при транскрипции в клетке млекопитающего дает РНК (также называемую в настоящей заявке мшРНК), имеющую две комплементарные части,

способные к самогибридизации с образованием двухцепочечного мотива, например, включающего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14-17 или 18-21, или последовательность, которая отличается от любой из вышеупомянутых последовательностей заменой одной пары оснований.

5

Комплементарные части, как правило, будут соединены спейсером, имеющим подходящую длину и последовательность, чтобы позволить двум дополнительным частям гибридизоваться друг с другом. Две комплементарные (то есть смысловая и антисмысловая) части могут быть соединены от 5'-конца к 3'-концу в любом порядке. Спейсер обычно будет представлять собой короткую последовательность, состоящую из приблизительно 4-12 нуклеотидов, предпочтительно 4-9 нуклеотидов, более предпочтительно 6-9 нуклеотидов.

10

Предпочтительно, 5'-конец спейсера (расположенный непосредственно с 3'-конца от расположенной против хода транскрипции комплементарной части) состоит из нуклеотидов –UU- или –UG-, опять же, предпочтительно –UU- (хотя, опять же, использование этих конкретных динуклеотидов не является существенным). Подходящим спейсером, рекомендованным для применения в системе pSuper от OligoEngine (Сиэтл, штат Вашингтон, США), является UUCAAGAGA. В этом и других случаях концы спейсера могут гибридизоваться друг с другом, например, вытягивая двухцепочечный мотив за пределы точных последовательностей SEQ ID NO: 14–17 или 18–21 на небольшое число (например, 1 или 2) пар оснований.

15

20

Подобным образом транскрибированная РНК предпочтительно включает 3'-липкий конец из расположенной по ходу транскрипции комплементарной части. Опять же, предпочтительно он представляет собой –UU или –UG, более предпочтительно –UU.

25

Такие молекулы мшРНК могут затем расщепляться в клетке млекопитающего ферментом DICER с получением двухцепочечной миРНК, как описано выше, в которой одна или каждая цепь гибридизированной дцРНК включает 3'-липкий конец.

30

Конечно, методики синтеза нуклеиновых кислот согласно изобретению хорошо известны в данной области техники.

Специалист в полной мере способен сконструировать подходящие векторы транскрипции для ДНК согласно изобретению, используя хорошо известные методики и коммерчески доступные материалы. В частности, ДНК будет связана с контрольными последовательностями, включая промотор и последовательность терминации транскрипции.

35

Особенно подходящими являются коммерчески доступные системы pSuper и pSuperior от OligoEngine (Сиэтл, штат Вашингтон, США). В них использован промотор полимеразы III (H1) и последовательность терминатора транскрипции T5, которая вносит два остатка U на 3'-конец

40

транскрипта (которые после процессинга посредством DICER обеспечивают 3'-UU-липкий конец одной цепи миРНК).

5 Другая подходящая система описана в Shin et al. (RNA, 2009 May; 15(5): 898-910), где используется другой промотор полимеразы III (U6).

10 Двухцепочечные миРНК согласно изобретению могут быть введены в клетки млекопитающих *in vitro* или *in vivo* с использованием известных методик, как описано ниже, для подавления экспрессии IL-11 или рецептора IL-11.

15 Аналогичным образом векторы транскрипции, содержащие ДНК согласно изобретению, могут быть введены в опухолевые клетки *in vitro* или *in vivo* с использованием известных методик, как описано ниже, для временной или стабильной экспрессии РНК, также для подавления экспрессии IL-11 или рецептора IL -11.

20 Соответственно, изобретение также относится к способу подавления экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 в клетке млекопитающего, например человека, включающему введение в указанную клетку двухцепочечной миРНК согласно изобретению или транскрипционного вектора согласно изобретению.

25 Аналогичным образом изобретение, кроме того, относится к способу лечения заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК, включающему введение субъекту двухцепочечной миРНК согласно изобретению или транскрипционного вектора согласно изобретению.

30 Изобретение, кроме того, относится к двухцепочечным миРНК согласно изобретению и транскрипционным векторам согласно изобретению для применения в способе лечения, предпочтительно в способе лечения заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.

35 Изобретение, кроме того, относится к применению двухцепочечных миРНК согласно изобретению и транскрипционных векторов согласно изобретению для получения лекарственного средства для лечения заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.

40 Изобретение, кроме того, относится к композиции, содержащей двухцепочечную миРНК согласно изобретению или транскрипционный вектор согласно изобретению в смеси с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. Подходящие носители включают липофильные носители или везикулы, которые могут способствовать проникновению через клеточную мембрану.

Материалы и способы, подходящие для введения дуплексов миРНК и ДНК-векторов согласно изобретению, хорошо известны в данной области техники, и в настоящее время разрабатываются улучшенные способы с учетом потенциала технологии РНКи.

- 5 В целом существует множество методов введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих. Выбор метода будет зависеть от того, переносится ли нуклеиновая кислота в клетки, культивируемые *in vitro*, или в клетки пациента *in vivo*. Методы, подходящие для переноса нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих *in vitro*, включают применение липосом, электропорацию, микроинъекцию, слияние клеток, ДЭАЭ, декстран и осаждение фосфата кальция.
- 10 Методы переноса генов *in vivo* включают трансфекцию вирусными (как правило, ретровирусными) векторами и трансфекцию, опосредованную белком оболочки вируса и липосомой (Dzau et al. (2003) Trends in Biotechnology 11, 205-210).

- В частности, подходящие методы клеточного введения нуклеиновых кислот согласно изобретению как *in vitro*, так и *in vivo* раскрыты в следующих статьях:
- 15

- Общие обзоры: Borkhardt, A. 2002. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment? Cancer Cell. 2:167-8. Hannon, G.J. 2002. RNA interference. Nature. 418:244-51. McManus, M.T., and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet. 3:737-47. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder. 2003b. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. Curr Med Chem. 10:245-56. Shuey, D.J., D.E. McCallus, and T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. Drug Discov Today. 7:1040-6.
- 20
- 25 Системная доставка с использованием липосом: Lewis, D.L., J.E. Hagstrom, A.G. Loomis, J.A. Wolff, and H. Herweijer. 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. Nat Genet. 32:107-8. Paul, C.P., P.D. Good, I. Winer, and D.R. Engelke. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nat Biotechnol. 20:505-8. Song, E., S.K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar, and J. Lieberman. 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med. 9:347-51. Sorensen, D.R., M. Leirdal, and M. Sioud. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. J Mol Biol. 327:761-6.
- 30

- Вирус-опосредованный перенос: Abbas-Terki, T., W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralong, and P. Aebischer. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. Hum Gene Ther. 13:2197-201. Barton, G.M., and R. Medzhitov. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 99:14943-5. Devroe, E., and P.A. Silver. 2002. Retrovirus-delivered siRNA. BMC Biotechnol. 2:15.
- 35
- Lori, F., P. Guallini, L. Galluzzi, and J. Lisiewicz. 2002. Gene therapy approaches to HIV infection. Am J Pharmacogenomics. 2:245-52. Matta, H., B. Hozayev, R. Tomar, P. Chugh, and P.M. Chaudhary. 2003. Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. Cancer Biol Ther. 2:206-10. Qin, X.F., D.S. An, I.S. Chen, and D. Baltimore. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. Proc Natl Acad Sci U S A. 100:183-8. Scherr, M., K.
- 40

Battmer, A. Ganser, and M. Eder. 2003a. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle*. 2:251-7. Shen, C., A.K. Buck, X. Liu, M. Winkler, and S.N. Reske. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett*. 539:111-4.

- 5 Доставка пептидов: Morris, M.C., L. Chaloin, F. Heitz, and G. Divita. 2000. Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol*. 11:461-6. Simeoni, F., M.C. Morris, F. Heitz, and G. Divita. 2003. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 31:2717-24. Другие технологии, которые могут быть подходящими для доставки миРНК в клетки-мишени, основаны на наночастицах или нанокапсулах, таких как описанные в патентах США № 6,649,192В и 5,843,509В.

#### Ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов

В вариантах реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать действие IL-11, могут обладать одним или более из следующих функциональных свойств:

- 15
- Ингибирование передачи сигнала, опосредованной IL-11;
  - Ингибирование передачи сигналов, опосредованной связыванием IL-11 с рецепторным комплексом IL-11R $\alpha$ :gp130;
  - Ингибирование передачи сигналов, опосредованной связыванием комплекса IL-11:IL-11R $\alpha$  с gp130 (т. е. *транс*-передачи сигналов IL-11);
- 20
- Ингибирование процесса, опосредованного IL-11;
  - Ингибирование образования миофибробластов;
  - Ингибирование пролиферации/миграции ГМК;
  - Ингибирование экспрессии генов/белков коллагена или IL-11.

25 Эти свойства могут быть определены путем анализа соответствующего агента в подходящем анализе, который может включать сравнение характеристик агента с подходящими контрольными агентами. Специалист может определить подходящие условия контроля для отдельно взятого анализа.

30 Опосредованная IL-11 передача сигналов и/или процессы, опосредованные IL-11, включают передачу сигналов, опосредованную фрагментами IL-11 и полипептидными комплексами, содержащими IL-11 или его фрагменты. Опосредованная IL-11 передача сигналов может представлять собой передачу сигналов, опосредованную человеческим IL-11 и/или мышинным IL-11. Опосредованная IL-11 передача сигналов может происходить после связывания IL-11 или

35 комплекса, содержащего IL-11, с рецептором, с которым связывается IL-11 или указанный комплекс.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать биологическую активность IL-11 или комплекса, содержащего IL-11.

В некоторых вариантах реализации агент является антагонистом одного или более сигнальных путей, которые активируются передачей сигнала посредством рецепторов, включающих IL-11R $\alpha$  и/или gp130, например, IL-11R $\alpha$ :gp130. В некоторых вариантах реализации агент способен ингибировать передачу сигналов посредством одного или более иммунных рецепторных комплексов, содержащих IL-11R $\alpha$  и/или gp130, например, IL-11R $\alpha$ :gp130.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня передачи сигналов в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента). В некоторых вариантах реализации агент может быть способен снижать опосредованную IL-11 передачу сигналов до менее чем 1 раза, например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня передачи сигналов в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента).

В некоторых вариантах реализации опосредованная IL-11 передача сигналов может представлять собой передачу сигналов, опосредованную связыванием IL-11 с рецептором IL-11R $\alpha$ :gp130. Такая передача сигналов может быть проанализирована, например, путем обработки клеток, экспрессирующих IL-11R $\alpha$  и gp130, с помощью IL-11, или путем стимуляции продукции IL-11 в клетках, экспрессирующих IL-11R $\alpha$  и gp130.

IC<sub>50</sub> агента для ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов может быть определена, например, путем культивирования клеток Ba/F3, экспрессирующих IL-11R $\alpha$  и gp130, в присутствии человеческого IL-11 и агента, и измерения включения <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК. В некоторых вариантах реализации агент может демонстрировать IC<sub>50</sub> в таком анализе, равную 10 мкг/мл или менее, предпочтительно  $\leq 5$  мкг/мл,  $\leq 4$  мкг/мл,  $\leq 3,5$  мкг/мл,  $\leq 3$  мкг/мл,  $\leq 2$  мкг/мл,  $\leq 1$  мкг/мл,  $\leq 0,9$  мкг/мл,  $\leq 0,8$  мкг/мл,  $\leq 0,7$  мкг/мл,  $\leq 0,6$  мкг/мл или  $\leq 0,5$  мкг/мл.

В некоторых вариантах реализации опосредованная IL-11 передача сигналов может представлять собой передачу сигналов, опосредованную связыванием комплекса IL-11:IL-11R $\alpha$  с gp130. В некоторых вариантах реализации комплекс IL-11:IL-11R $\alpha$  может быть растворимым, например комплекс внеклеточного домена IL-11R $\alpha$  и IL-11, или комплекс растворимой изоформы/фрагмента IL-11R $\alpha$  и IL-11. В некоторых вариантах реализации растворимый IL-11R $\alpha$  представляет собой растворимую (секретируемую) изоформу IL-11R $\alpha$ , или представляет собой продукт, высвобождаемый при протеолитическом расщеплении внеклеточного домена связанного с клеточной мембраной IL-11R $\alpha$ .



В некоторых вариантах реализации комплекс IL-11:IL-11R $\alpha$  может быть связан с клеткой, например, комплекс связанного с клеточной мембраной IL-11R $\alpha$  и IL-11. Передача сигналов, опосредованная связыванием комплекса IL-11:IL-11R $\alpha$  с gp130, может быть проанализирована путем обработки клеток, экспрессирующих gp130, комплексом IL-11:IL-11R $\alpha$ , например, 5 рекомбинантным слитым белком, содержащим IL-11, соединенный пептидным линкером с внеклеточным доменом IL-11R $\alpha$  (например, hyper IL-11, как описано в настоящей заявке).

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать передачу сигналов, опосредованную связыванием комплекса IL-11:IL-11R $\alpha$  с gp130, и также способен ингибировать 10 передачу сигналов, опосредованную связыванием IL-11 с рецептором IL-11R $\alpha$ :gp130.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать процесс, опосредованный IL-11, например, после стимуляции с помощью TGF $\beta$ 1. Процессы, опосредованные IL-11, включают, например, образование миофибробластов из фибробластов, 15 пролиферацию/миграцию ГМК и экспрессию генов/белков, например, коллагена и IL-11, и могут быть оценены *in vitro* либо *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать образование миофибробластов из фибробластов, например, после воздействия на фибробласты 20 профибротического фактора (например, TGF $\beta$ 1). Образование миофибробластов из фибробластов может быть исследовано с помощью анализа на маркеры миофибробластов.

Фибробласты могут быть получены из любой ткани, включая печень, легкие, почки, сердце, кровеносные сосуды, глаз, кожу, поджелудочную железу, селезенку, кишечник (например, толстую 25 или тонкую кишку), головной мозг и костный мозг. В частных вариантах реализации фибробласты могут представлять собой сердечные фибробласты (например, фибробластами предсердий), фибробласты кожи, легочные фибробласты, почечные фибробласты или печеночные фибробласты. Фибробласты могут характеризоваться экспрессией генов или белков одного или более из COL1A, ACTA2, пролил-4-гидроксилазы, MAS516 и FSP1. Маркеры миофибробластов 30 могут включать один или более из повышенного  $\alpha$ SMA, виментина, палладина, кофилина или десмина (по сравнению с уровнем экспрессии в сопоставимых фибробластах (например, фибробластах, происходящих из той же ткани)).

Образование миофибробластов из фибробластов может быть проанализировано путем измерения 35 уровней экспрессии белка  $\alpha$ SMA с использованием высокопроизводительной системы визуализации Operetta после стимуляции фибробластов с помощью TGF $\beta$ 1; см., например, источник WO 2017/103108 A1, настоящим полностью включенный посредством ссылки во всей полноте.

40 В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать образование миофибробластов из фибробластов до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или

менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня образования миофибробластов из фибробластов в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента). В некоторых вариантах реализации агент может быть способен снижать образование миофибробластов из фибробластов до менее чем 1 раз, например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня образования миофибробластов из фибробластов в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента).

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать пролиферацию ГМК (например, секреторных ГМК), например, после стимуляции с помощью TGF $\beta$ 1. Пролиферация ГМК может быть измерена с использованием, например, анализов включения  $^3\text{H}$ -тимидина, разведения CFSE или включения EdU, как описано в настоящей заявке.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать пролиферацию ГМК до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня пролиферации в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента). В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать пролиферацию ГМК до менее чем 1 раз, например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня пролиферации в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента).

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать миграцию ГМК (например, секреторных ГМК), например, после стимуляции с помощью TGF $\beta$ 1. Миграция ГМК может быть измерена с помощью анализа методом «царапин», например, как описано в примере 9 и в Liang et al., Nat Protoc. (2007) 2(2):329-33, или с использованием анализа в камере Бойдена, как описано в примере 9 и в Chen, Methods Mol Biol. (2005) 294:15-22.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать миграцию ГМК до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня миграции в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента). В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать миграцию ГМК до менее чем 1 раз,

например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня миграции в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента).

5 В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать экспрессию генов/белков коллагена или IL-11. Экспрессия генов и/или белков может быть измерена, как описано в настоящей заявке.

10 В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать экспрессию генов/белков коллагена или IL-11 до менее чем 100%, например, 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% от уровня экспрессии в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента). В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать экспрессию генов/белков коллагена или IL-11 до менее чем 1 раза, например, до  $\leq 0,99$  раз,  $\leq 0,95$  раз,  $\leq 0,9$  раз,  $\leq 0,85$  раз,  $\leq 0,8$  раз,  $\leq 0,75$  раз,  $\leq 0,7$  раз,  $\leq 0,65$  раз,  $\leq 0,6$  раз,  $\leq 0,55$  раз,  $\leq 0,5$  раз,  $\leq 0,45$  раз,  $\leq 0,4$  раз,  $\leq 0,35$  раз,  $\leq 0,3$  раз,  $\leq 0,25$  раз,  $\leq 0,2$  раз,  $\leq 0,15$  раз,  $\leq 0,1$  раз от уровня экспрессии в отсутствие агента (или в присутствии подходящего контрольного агента).

20

#### Дисфункция и патология ГМК

Дисфункция ГМК наблюдается при многих заболеваниях/состояниях, при которых эти клетки аберрантно пролиферируют, гипертрофированы, мигрируют, осуществляют инвазию, продуцируют и/или модифицируют внеклеточный матрикс и погибают.

25

ГМК секреторного фенотипа являются патологическими эффекторами при таких заболеваниях/состояниях. Развитие или прогрессирование заболевания/состояния и/или симптомов заболевания/состояния может находиться в прямой зависимости от одного или нескольких видов активности секреторных ГМК. То есть, активность секреторных ГМК может вызывать или способствовать (например, усугублять/усиливать) развитие/прогрессирование заболевания/состояния и/или симптомов заболевания/состояния.

30

35 В некоторых случаях заболевание/состояние может быть вызвано/усугублено аберрантным переключением фенотипа сократительных ГМК на секреторный фенотип ГМК. В некоторых случаях заболевание/состояние может быть вызвано/усугублено увеличением количества/доли секреторных ГМК в данной ткани/оргane/системе органов/пациенте (например, по сравнению с количеством/долей в отсутствие заболевания/состояния).

40 Заболевания, характеризующиеся дисфункцией сосудистых ГМК, включают атеросклероз, гипертензию, сосудистые аневризмы, стеноз и рестеноз сосудов, атеросклероз, надклапанный стеноз, легочную артериальную гипертензию, плексиформные поражения, фиброзномышечную

дисплазию, телеангиэктазию и другие. Дисфункция ГМК во внутренних органах связана, например, с дисфагией, диареей, запором, нарушениями со стороны почек и мочевого пузыря, и она также связана с респираторными состояниями, такими как астма, муковисцидоз, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС).

5

В следующих разделах приведено более подробное описание, относящееся к заболеваниям/состояниям, при которых патологически вовлечены ГМК.

#### *Системный склероз/склеродермия*

10 Склеродермия (ССД) представляет собой состояние соединительной ткани, характеризующееся сложными взаимодействиями между эндотелиальными клетками, СГМК, внеклеточным матриксом и циркулирующими медиаторами, способствующими ремоделированию сосудов, спазму сосудов и окклюзии сосудов<sup>8</sup>. СГМК участвуют в формировании фиброзных поражений интимы при SSc<sup>9</sup>.  
15 Пациенты с ССД могут быть гиперчувствительными к передаче сигналов TGF $\beta$ , что важно для патогенеза заболевания<sup>2</sup>.

#### *Легочная артериальная гипертензия*

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) является редким заболеванием, но распространенным осложнением состояний соединительной ткани, наиболее распространенным из которых является  
20 ССД. Повреждение эндотелия, сопровождаемое активацией миграции ГМК, пролиферацией и накоплением внеклеточного матрикса в сочетании с пролиферацией эндотелиальных клеток, является определяющей патологией, лежащей в основе ЛАГ<sup>10</sup>. СГМК подвергаются смене фенотипа от сократительного к секреторному в присутствии провоспалительных, гипоксических и митогенных стимулов, что вызывает поражения, наблюдаемые при ЛАГ<sup>11</sup>.

25

Первичная генетическая причина ЛАГ связана с потерей функциональных мутаций в BMPR2<sup>12</sup>, отрицательном регуляторе функции гладких мышц и TGF $\beta$ . В семейных случаях до 70% людей будут иметь мутации BMPR2, связанные с пролиферацией СГМК и развитием ЛАГ.

30 Плексиформные поражения, обычно расположенные в точках ветвления мышечных артерий, являются отличительной чертой ЛАГ и состоят из сети сосудистых каналов, выстеленных эндотелиальными клетками, с сердцевиной из миофибробластных клеток<sup>10</sup>. Потеря цитостатической передачи сигналов от TGF $\beta$  рассматривают в качестве причины аномальной пролиферации плексиформных поражений<sup>10</sup>.

35

#### *Синдром Марфана, аневризмы аорты и другие связанные заболевания*

Синдром Марфана (MFS) является аутосомно-доминантным состоянием соединительной ткани, которое поражает несколько систем органов<sup>13</sup>. В образцах аорты от пациентов с MFS<sup>14</sup> наблюдаются повышенные уровни белков pSMADs 2/3 и RhoA, что указывает на усиление  
40 передачи сигналов TGF $\beta$ . Повышенная передача сигналов TGF $\beta$  при MFS была признана центральной догмой для патогенеза MFS на основе серии экспериментов, проведенных Dietz lab<sup>14</sup>.

<sup>17</sup> на протяжении более десяти лет. Нейтрализующие TGF $\beta$  антитела могут снижать скорость расширения корня аорты, улучшать архитектуру стенки аорты и поддерживать эластичные волокна, уменьшать толщину стенки аорты и уменьшать отложение коллагена в моделях MFS<sup>18</sup>.

5 Синдром Фурлонга и синдром Шпрингцен-Гольдберга являются MFS-подобными заболеваниями, которые проявляются ранним закрытием швов черепа, расслоением аорты, и ранним закрытием швов черепа, умственной отсталостью, соответственно<sup>13</sup>. При этих заболеваниях были выявлены мутации T $\beta$ R1 и TGF $\beta$ R2, что может объяснить фенотипическое перекрытие между ними<sup>13</sup>. Аналогичным образом синдром Луиса-Дитца (соматические мутации в TGF $\beta$ R1 и TGF $\beta$ R2),  
10 семейный синдром аневризмы грудного отдела аорты (мутация зародышевой линии в TGF $\beta$ R2 и миссенс-мутация в TGF $\beta$ R1) и синдром извилистых артерий характеризуются схожими с MFS сосудистыми проявлениями, что дополнительно подчеркивает важность передачи сигналов TGF $\beta$ <sup>19</sup>.

### 15 *Аневризмы сосудов головного мозга*

Аневризмы сосудов головного мозга возникают в артериях головного мозга, главным образом в точках ветвления, где гемодинамическое напряжение сдвига является высоким<sup>20</sup>. Изменение фенотипа СГМК (на провоспалительный, секреторный фенотип) увеличивает экспрессию MMP и способствует потере внутренней эластической пластинки, в результате чего образуется  
20 большинство аневризм сосудов головного мозга<sup>20</sup>. Исследования показали соответствующие морфологические изменения (от веретенообразных до паукообразных клеток) и снижение экспрессии и окрашивания сократительных маркеров (тяжелая цепь гладкомышечного миозина и  $\alpha$ -гладкомышечного актина) в ГМК<sup>21</sup>. Из-за его связи с TGF $\beta$ <sup>20</sup> и других факторов, которые могут иметь косвенную связь с путем передачи сигнала IL-11, ингибирование опосредованной IL-11  
25 передачи сигналов может быть полезным для предупреждения или лечения аневризм сосудов головного мозга.

### 30 *Рестеноз*

Рестеноз характеризуется фиброзом, пролиферацией СГМК и ремоделированием в результате ятрогенных причин повреждения сосудов, например, ангиопластики<sup>13</sup>. Апоптоз СГМК стимулирует агрегацию тромбоцитов и фибрина. Тромбин также является мощным индуктором продукции факторов роста, пролиферации СГМК и накопления ВКМ. Кроме того, активированные тромбоциты  
35 высвобождают вазоконстрикторы (тромбоксан, серотонин) и митогены, такие как PDGF (мощный индуктор), EGF и TGF, которые усиливают этот пролиферативный процесс. Уровни мРНК TGF $\beta$  сильно повышены в образцах рестеноза человека<sup>22</sup>. Сверхэкспрессия TGF $\beta$  в неповрежденных свинных артериях приводит к увеличению накопления ВКМ и клеточной пролиферации в стенке артерии<sup>23</sup>. Аналогичным образом было показано, что блокада TGF $\beta$  антителами подавляет  
40 рестеноз в кроличьих сонных артериях, поврежденных баллонным катетером<sup>24</sup>. В стенозированных поражениях человека SMAD3 активирован по сравнению с первичными атеросклеротическими

бляшками<sup>25</sup>. Сверхэкспрессия SMAD3 связана с повышенным отношением интимы к медиальному слою и увеличением медиальной и субинтимальной клеточной пролиферации (PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток)-положительные клетки)<sup>26</sup>. Сверхэкспрессия (ингибирующего) SMAD 7 также снижает рестеноз после ангиопластики<sup>27</sup>. Эти исследования выдвигают гипотезу о тесной связи между рестенозом и передачей сигналов TGF $\beta$ .

#### *Атеросклероз*

Атеросклероз представляет собой хронический воспалительный ответ артериальной стенки, вызванный повреждением в результате, например, химических повреждений (гипергликемия), модифицированного липопротеина низкой плотности (ЛПНП) или физических сил (гипертензия)<sup>28</sup>. Проллиферация и миграция СГМК необходимы для стабильности атеросклеротических бляшек<sup>29</sup>. Известно, что на поздних стадиях атеросклероза апоптоз СГМК из-за активности воспалительных клеток вызывает разрыв бляшки. Было показано, что передача сигналов TGF $\beta$  ингибирует пролиферацию, миграцию и стимулирует апоптоз СГМК и эндотелиальных клеток<sup>13</sup>. Было показано, что СГМК, выделенные из атеросклеротических поражений человека, устойчивы к антипролиферативному и апоптотическому действиям TGF $\beta$  и обладают мутациями в T $\beta$ RII и/или сниженной экспрессией T $\beta$ RII<sup>30</sup>. Блокирование системной передачи сигналов TGF $\beta$  посредством нейтрализующих антител<sup>31</sup>, экспрессия доминантных негативных рецепторов II типа<sup>32</sup> и направленная делеция одного аллеля<sup>33</sup> ухудшают атеросклероз. Повышение TGF $\beta$  посредством введения тамоксифена улучшает атеросклероз<sup>34</sup>.

#### *Фибромышечная дисплазия*

Фибромышечная дисплазия (ФМД) - это редкое неартериосклеротическое заболевание, поражающее артерии среднего размера, и является известной причиной стеноза артерий, неравномерного утолщения, расслоения и аневризм<sup>35</sup>. Наиболее распространенным является поражение почечных артерий (60–75%), за которым следуют шейно-черепные артерии (25–30%), висцеральные артерии (9%) и артерии конечностей (5%)<sup>36</sup>. Гистопатологически повреждения при ФД классифицируют на основе основного затронутого слоя артерии (медиа, интима или адвентиция) и состава артериального поражения (отложение коллагена, известное как фиброплазия, или, реже, гиперплазия гладкомышечных клеток)<sup>35</sup>. У пациентов с ФМД были продемонстрированы повышенная секреция TGF $\beta$ 1 и TGF $\beta$ 2, а также повышенные уровни циркулирующих TGF $\beta$ 1 и TGF $\beta$ 2 по сравнению с соответствующими контролями<sup>37</sup>.

#### *Стеноз почечной артерии*

Стеноз почечной артерии представляет собой заболевание, которое охватывает три основных клинических синдрома: ишемическая нефропатия, гипертензия и дестабилизирующие сердечные синдромы<sup>38</sup>. Наиболее распространенными причинами СПА являются атеросклероз (90%) и фибромышечная дисплазия (10%), поэтому патофизиология соответствует обоим этим заболеваниям<sup>38</sup>.

#### *Гипертензия*

Ангиотензин II (AGII) регулирует передачу сигналов СГМК посредством MAPK (киназа ERK1/2, JNK и p38), янус-киназа (JAK)/сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции (STAT), NF-κB и фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K)<sup>39</sup>. Накопление ВКМ посредством СГМК и рост СГМК важны для ремоделирования сосудов при гипертензии, в частности, при гипертензии, связанной со старением, когда эластичность сосудов снижается, а систолическое артериальное давление повышается<sup>39</sup>. У крыс с гипертензией СГМК демонстрируют более высокие пролиферативные и миграционные тенденции по сравнению с контрольными животными дикого типа<sup>40</sup>. Снижение сократительных маркеров, а именно, гладкомышечного актина (SMA) и SM22α, связано со снижением PPAR-γ у крыс, и поэтому гипертензия может регулировать переключение фенотипа СГМК посредством ингибирования вызванной PPAR-γ передачи сигналов PI3K/Akt<sup>40</sup>. В самом последнем и очень крупном GWAS (полногеномном поиске ассоциаций) функция СГМК строго аннотирована как важная детерминанта артериального давления<sup>41</sup>.

#### *Заболевание почек*

Фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), IgA-нефропатия, серповидный гломерулонефрит, волчаночный нефрит и диабетическая нефропатия (ДН) являются важными заболеваниями почек<sup>42</sup>. Пролиферация мезангиальных клеток важна для прогрессирования этих заболеваний почек, которые приводят к гломерулосклерозу, и этот процесс очень похож на атеросклероз. Мезангиальные клетки очень похожи на СГМК с точки зрения происхождения, микроскопической анатомии, гистохимии и сократимости<sup>43</sup>, и могут представлять собой подтип СГМК. Мезангиальные клетки выделяют и окружают себя мезангиальным матриксом, играющим ключевую роль в структурной поддержке клубочка. При патологических состояниях мезангиальные клетки дедифференцируются в миофибробластоподобный фенотип (мезангиобласт), аналогично переключению фенотипа, который проявляют СГМК в ответ на повреждение сосудов, и продуцируют избыток компонентов матрикса<sup>44</sup>. Во время дедифференцировки мезангиальные клетки также повышают экспрессию маркеров, таких как αSMA. Повышение размера мезангиального компартмента в результате накопления мезангиального матрикса, а также пролиферации и гипертрофии мезангиальных клеток является отличительной чертой гломерулосклероза<sup>45</sup>. Как и в случае СГМК, PDGF (фактор роста тромбоцитов), как было установлено, является мощным индуктором пролиферации мезангиальных клеток<sup>42</sup>. Другие существенные факторы транскрипции, способствующие пролиферации мезангиальных клеток, включают c-fos, c-myc и c-jun. C-fos димеризуется с c-jun с образованием комплекса AP-1, который трансактивирует ряд генов-мишеней<sup>42</sup>. Пролиферация мезангиальных клеток и/или СГМК или сократительная дисфункция эфферентной клубочковой артерии может привести к дисфункции клубочков и гипертензии.

#### *Заболевание легких*

Клетки гладких мышц дыхательных путей (ДГМК) активно участвуют в таких заболеваниях легких, как астма, муковисцидоз и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)<sup>46</sup>. Клетки гладких мышц дыхательных путей характеризуются сравнительно более низкой экспрессией сократительных белков, таких как тяжелая цепь гладкомышечного миозина, кальпонин и α-

гладкомышечный актин, и они остаются в режиме пролиферации<sup>47</sup>. TGF $\beta$  увеличивает экспрессию гладкомышечных сократительных белков, таких как  $\alpha$ -гладкомышечный актин и кальпонин, в гладких мышцах дыхательных путей и фибробластах, а также увеличивает размер и количество гладкомышечных клеток дыхательных путей<sup>48</sup>.

5

### *Астма*

Астма является хроническим заболеванием, которым страдают более 300 миллионов пациентов во всем мире, и ежегодно с ней связывают 250 000 смертей. Астма характеризуется воспалением дыхательных путей, гиперреактивностью и ремоделированием<sup>49</sup>. Частая стимуляция ГМК  
 10 дыхательных путей (ДГМК) сократительными агонистами, медиаторами воспаления и факторами роста вызывает структурное ремоделирование, приводящее к необратимой обструкции дыхательных путей на поздних стадиях заболевания. Одним из различных идентифицированных медиаторов является TGF $\beta$ <sup>50</sup>. McMillan et al. продемонстрировали, что мыши, получавшие антитела к TGF $\beta$ , демонстрировали значительно сниженное накопление перибронхиолярного  
 15 внеклеточного матрикса, пролиферацию гладкомышечных клеток дыхательных путей и выработку слизи в легких без влияния на хроническое воспаление дыхательных путей и продукцию цитокинов Th2<sup>51</sup>. Первичное лечение острых обострений астмы заключается в бета-блокаде, которая уменьшает сократимость ДГМК, что подчеркивает ключевую роль ДГМК в астме<sup>52</sup>. ДГМК также продуцируют коллаген и секретируют провоспалительные цитокины, которые способствуют  
 20 патогенезу заболевания<sup>53</sup>.

### *Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)*

ХОБЛ является хроническим заболеванием легких, которое, по оценкам, является причиной 3 миллионов смертей во всем мире каждый год. ХОБЛ характеризуется восстановлением тканей и  
 25 эпителиальной метаплазией, которые способствуют утолщению стенки дыхательных путей и нарушению проходимости дыхательных путей<sup>48</sup>. Исследования показали, что количество гладких мышц дыхательных путей находится в обратной зависимости от функции легких, и что фиброз адвентициального слоя перибронхиальной области может ограничивать степень расслабления, вызванного бронхолитическими средствами, такими как  $\beta$ -агонисты или антихолинергические  
 30 препараты<sup>48</sup>. Показано, что TGF $\beta$  сверхэкспрессируется в эпителии дыхательных путей и ДГМК курильщиков с ХОБЛ по сравнению с курильщиками без ХОБЛ<sup>54</sup>.

### *Патология кишечника*

Клетки гладких мышц кишечника (КГМК) играют важную роль в формировании стриктуры в стенках  
 35 кишечника (например, стриктуры подвздошной кишки). Этот процесс обычно наблюдается при воспалительных заболеваниях кишечника (например, целиакии, синдроме раздраженного кишечника, болезни Крона и язвенном колите) и других состояниях, которые приводят к воспалению и утолщению стенки кишечника. В физиологических условиях КГМК являются сократительными и непролиферативными и необходимы для нормальной функции кишечника<sup>55</sup>.  
 40 Однако в ответ на различные патологические состояния они дедифференцируются, повторно входят в клеточный цикл, гипертрофируются и их фенотип переключается на секреторный



фенотип ГМК<sup>55</sup>. Интерстициальные клетки Кахаля, расположенные в мышечной стенке кишечника, являются специфическим типом ГМК, который регулирует перистальтику кишечника. Эти клетки особенно предрасположены к трансформации в секреторные ГМК, которая неблагоприятно влияет на сокращение кишечника (Vetuschi et al., Eur J Clin Invest. (2006) 36(1):41-8). Кишечные ГМК  
 5 обладают способностью быстро пролиферировать, синтезировать и секретировать ВКМ, такой как коллаген. Эксперименты *in vitro* показали, что TGFβ вызывает 100% увеличение абсолютного синтеза коллагена на клетку в КГМК<sup>56</sup>.

#### *Синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS)*

10 HGPS является тяжелым состоянием преждевременного старения человека, вызваемым мутантом ламина А под названием прогерин. С этой смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с прогерией обычно связывают значительную потерю СГМК<sup>57</sup>. Было показано, что экспрессия прогерина снижает уровень PARP1, что, в свою очередь, вызывает митотическую катастрофу, приводящую к гибели ГМК<sup>57</sup>. TGFβ и SMAD при прогерии повышены, и путь MAPK  
 15 является одним из путей, которые подвергаются изменениям при этом заболевании<sup>58</sup>.

#### *Лейомиома и лейомиосаркома*

Лейомиома, также известная как фиброма, представляет собой доброкачественную опухоль гладких мышц, которая может возникнуть в любом органе. Лейомиомы обычно встречаются в матке (т. е. представляют собой лейомиомы/фибромы матки), пищеводе, желудке и кишечнике.  
 20 Они преимущественно возникают в результате пролиферации одной гладкомышечной клетки и включают в себя фенотипы сосудистых ГМК. Было также обнаружено, что фибромы матки включает дифференцированные клеточные популяции, такие как фибробласты и фибробласты, ассоциированные с фибромой<sup>65</sup>.

25 Лейомиомы могут возникать в коже, например, одиночная кожная лейомиома, множественные кожные (или pilarные) лейомиомы, возникающие из мышц, поднимающих волосы, ангиолейомиомы (сосудистые лейомиомы), которые возникают из гладкой мускулатуры сосудов, дартоидные (или генитальные) лейомиомы, происходящие из мышц dartos гениталий, ареолы и соска, и ангиолиполейомиома.

30 Сообщается, что измененная передача сигналов 17β-эстрадиола (E2) при лейомиомах вызывает активацию MAPK и патологическую пролиферацию клеток посредством повышения уровней фосфорилированного ERK1 /2<sup>66</sup>.

35 Лейомиосаркома (ЛМС) представляет собой злокачественную опухоль гладких мышц, которая может возникнуть в любом органе. Обычно считается, что лейомиомы не превращаются в злокачественную ЛМС, но лейомиосаркомы часто сосуществуют в контексте фибромы, например, фибромы матки<sup>67</sup>. ЛМС обычно экспрессируют гладкомышечный актин (SMA), десмин и кальдесмон и, таким образом, может демонстрировать секреторный фенотип ГМК.

40

*Синдром Германски-Пудлака (СГП)*

СГП является редким аутосомно-рецессивным заболеванием, характеризующимся окулокутаным альбинизмом и дисфункцией тромбоцитов. У людей с СГП может развиваться фатальный фиброз легких, воспаление желудочно-кишечного тракта и/или толстой кишки (колит), и/или почечная недостаточность<sup>68</sup>. На мышиных моделях ГСП развивается фиброз в легких и проявляются повышенные уровни TGF $\beta$ 1<sup>69</sup>.

Лечение/предупреждение заболеваний/состояний, связанных с ГМК

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения/предупреждения заболеваний и состояний, связанных с дисфункцией ГМК. Заболевания/состояния, подлежащие лечению/предупреждению в соответствии с настоящим изобретением, могут называться связанными с ГМК или опосредованными ГМК.

В частности, изобретение относится к способам и композициям для лечения/предупреждения заболеваний и состояний, при которых патологически вовлечены секреторные ГМК.

Способы обычно включают ингибирование секреторной активности ГМК, то есть ингибирование (снижение уровня) функционального свойства секреторных ГМК. Это достигается путем ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов.

То есть настоящее изобретение обеспечивает лечение/предупреждение заболеваний/состояний, вызванных/усугубленных секреторными ГМК, посредством ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов, например, в клетке, ткани/органе/системе органов/субъекте.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что терапевтическое и профилактическое применение настоящего изобретения распространяется, по существу, на любое заболевание/состояние, на которое окажет благоприятное действие снижение количества или активности секреторных ГМК.

Заболевание/состояние, при котором секреторные ГМК являются «патологически вовлеченными», может представлять собой, например, заболевание/состояние, при котором секреторные ГМК или увеличенное количество/доля секреторных ГМК находятся в прямой зависимости от начала, развития или прогрессирования указанного заболевания/состояния и/или тяжести одного или более симптомов указанного заболевания/состояния, или заболевание/состояние, при котором секреторные ГМК или увеличение количества/доли секреторных ГМК являются фактором риска для начала, развития или прогрессирования указанного заболевания/состояния. Секреторные ГМК могут присутствовать в органе/ткани, пораженных заболеванием (например, органе/ткани, в которых проявляются симптомы заболевания/состояния). Доля секреторных ГМК может быть определена как доля от общего количества секреторных ГМК плюс несекреторные ГМК (например, сократительные ГМК) в соответствующем органе/ткани.

В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой заболевание, характеризующееся увеличением количества/доли/активности секреторных ГМК, например, в органе/ткани, пораженных указанным заболеванием/состоянием (например, органе/ткани, в которых проявляются симптомы указанного заболевания/состояния).

В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, может характеризоваться увеличением одного или более из следующего в органе/ткани/субъекте, пораженных заболеванием, например, по сравнению с нормальными (то есть, без заболевания) органом/тканью/субъектом: количество/доля/активность секреторных ГМК, экспрессия одного или более из компонента внеклеточного матрикса (например, коллагена I), IL-11, остеопонтина, I-кальдесмона, NM-B MHC (тяжелая цепь немышечного миозина), виментина, тропомиозина 4, CRBP-1, секреторных везикул и интегрин  $\alpha 4\beta 1$ . В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, может характеризоваться увеличением одного или более из следующего в органе/ткани/субъекте, пораженных заболеванием, например, по сравнению с нормальными (то есть, без заболевания) органом/тканью/субъектом: количество/доля/активность секреторных ГМК, экспрессия одного или более из компонентов внеклеточного матрикса, коллагена и IL-11.

В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, может характеризоваться уменьшением одного или более из следующего в органе/ткани/субъекте, пораженных заболеванием, например, по сравнению с нормальными (то есть, без заболевания) органом/тканью/субъектом: количество/доля сократительных ГМК, экспрессия одного или более из миозина 11, смузелина, SMMHC,  $\alpha$ SMA, SM22 $\alpha$ , h1-кальпонины, h-кальдесмона, интегрин  $\alpha 1\beta 1$ , интегрин  $\alpha 7\beta 1$ , актиновых филаментов и дистрофин-гликопротеинового комплекса (DGPC). В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, может характеризоваться снижением одного или более из следующего в органе/ткани/субъекте, пораженных заболеванием, например, по сравнению с нормальными (то есть, без заболевания) органом/тканью/субъектом: количество/доля сократительных ГМК, экспрессия одного или более из миокардина и SM22 $\alpha$ .

Заболевание/состояние может поражать любую ткань, или орган, или систему органов. В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние может поражать несколько тканей/органов/систем органов.

В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние поражает одно или более из: сердечно-сосудистой системы, пищеварительной системы, выделительной системы, дыхательной системы, почечной системы или репродуктивной системы.

В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, поражает один или более органов сердечно-сосудистой системы,

например, кровеносные сосуды (т. е. представляет собой сосудистое заболевание/состояние). В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние представляет собой одно или более из: атеросклероза, гипертензии, сосудистой аневризмы, синдрома Марфана, аневризмы аорты, синдрома Фурлонга, синдрома Сфринтцена-Голдберга, синдрома Луиса-Дитца, семейного синдрома аневризмы грудного отдела аорты, синдрома извитости артерий, аневризмы сосудов головного мозга, стеноза и рестеноза сосудов, атеросклероза, фиброзно-мышечной дисплазии (ФМД), надклапанного стеноза, стеноза почечной артерии, легочной артериальной гипертензии (ЛАГ), плексиформных поражений, фиброзно-мышечной дисплазии, телеангиэктазии, системного склероза, синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS), лейомиомы или лейомиосаркомы.

10 В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, поражает один или более органов пищеварительной или выделительной систем. В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние представляет собой одно или более из: ахалазии, дисфагии, диареи, запора, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), стриктуры кишечника, стеноза привратника, целиакии, синдрома раздраженного кишечника, дивертикулита, болезни Крона, язвенного колита или синдрома Германски-Пудлака (СГП).

20 В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, поражает один или более органов дыхательной системы, например, дыхательные пути (т. е. представляет собой респираторное заболевание/состояние). В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние представляет собой одно или более из заболевания легких, астмы, муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких (ОБДЛ), острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS) или синдрома Германски-Пудлака (СГП).

25 В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, поражает один или более органов почечной системы, например, почки или мочевого пузыря (т. е. представляет собой заболевание/состояние почечной системы). В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние представляет собой одно или более из: заболевания почечной системы, фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС), IgA-нефропатии, серповидного гломерулонефрита, волчаночного нефрита, диабетической нефропатии (ДН), заболевания мочевого пузыря или синдрома Германски-Пудлака (СГП).

35 В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, представляет собой одно или более из: атеросклероза, гипертензии, сосудистой аневризмы, синдрома Марфана, аневризмы аорты, синдрома Фурлонга, синдрома Сфринтцена-Голдберга, синдрома Луиса-Дитца, семейного синдрома аневризмы грудного отдела аорты, синдрома извитости артерий, аневризмы сосудов головного мозга, стеноза и рестеноза сосудов, атеросклероза, фиброзно-мышечной дисплазии (ФМД), надклапанного стеноза, стеноза почечной артерии, легочной артериальной гипертензии (ЛАГ), плексиформных поражений, фиброзно-мышечной дисплазии, телеангиэктазии, ахалазии, дисфагии, диареи, запора,

40

- воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), стриктуры кишечника, стеноза привратника, целиакии, синдрома раздраженного кишечника, дивертикулита, болезни Крона, язвенного колита, заболевания почечной системы, фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС), IgA-нефропатии, серповидного гломерулонефрита, волчаночного нефрита, диабетической нефропатии (ДН), болезни мочевого пузыря, болезни легких, астмы, муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), системного склероза, синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS), лейомиомы, лейомиосаркомы и синдрома Германски-Пудлака (СГП).
- 5
- 10 В некоторых вариантах реализации заболевание/состояние не является заболеванием/состоянием, поражающим один или более органов дыхательной системы, например, дыхательные пути (т. е. не представляет собой респираторное заболевание/состояние). В вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, представляет собой одно или более из: атеросклероза, гипертензии, сосудистой аневризмы,
- 15 синдрома Марфана, аневризмы аорты, синдрома Фурлонга, синдрома Сфринтцена-Голдберга, синдрома Луиса-Дитца, семейного синдрома аневризмы грудного отдела аорты, синдрома извитости артерий, аневризмы сосудов головного мозга, стеноза и рестеноза сосудов, атеросклероза, фиброзно-мышечной дисплазии (ФМД), надклапанного стеноза, стеноза почечной артерии, легочной артериальной гипертензии (ЛАГ), плексиформных поражений, фиброзно-
- 20 мышечной дисплазии, телеангиэктазии, ахалазии, дисфагии, диареи, запора, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), стриктуры кишечника, стеноза привратника, целиакии, синдрома раздраженного кишечника, дивертикулита, болезни Крона, язвенного колита, заболевания почечной системы, фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС), IgA-нефропатии, серповидного гломерулонефрита, волчаночного нефрита, диабетической нефропатии (ДН),
- 25 болезни мочевого пузыря, системного склероза, синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS), лейомиомы, лейомиосаркомы и патологии при синдроме Германски-Пудлака (СГП), не связанной с дыхательными путями/легкими. В вариантах реализации заболевание/состояние, подлежащее лечению/предупреждению, не является заболеванием легких, астмой, муковисцидозом, хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), острым респираторным
- 30 дистресс-синдромом (ОРДС) или патологией дыхательных путей/легких при синдроме Германски-Пудлака (СГП)

Лечение/предупреждение заболеваний и состояний в соответствии с настоящим изобретением может проводиться в отношении заболевания/состояния, связанного с активацией IL-11, например

35 активацией IL-11 в клетках или тканях, в которых проявляются или могут возникать симптомы заболевания/состояния, или активацией внеклеточного IL-11 или IL-11R $\alpha$ .

Лечение может быть эффективным для предупреждения прогрессирования заболевания/состояния, например, для уменьшения/задержки/предотвращения ухудшения

40 заболевания/состояния, или для уменьшения/задержки/предотвращения развития заболевания/состояния. В некоторых вариантах реализации лечение может приводить к

улучшению заболевания/состояния, например, уменьшению тяжести и/или обратному развитию симптомов заболевания/расстройства. В некоторых вариантах реализации лечение может увеличить выживаемость.

- 5 Предупреждение может относиться к предупреждению развития заболевания/состояния и/или предупреждению ухудшения заболевания/состояния, например, предотвращению прогрессирования заболевания/состояния до более поздней или хронической стадии.

#### *Введение*

- 10 Введение агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, предпочтительно осуществляют в «терапевтически эффективном» или «профилактически эффективном» количестве, причем этого количества достаточно, чтобы принести пользу субъекту.

- 15 Фактическое вводимое количество, а также скорость и временная динамика введения будут зависеть от природы и тяжести заболевания/состояния, а также природы агента. Назначение лечения, например, решение о дозировке и т. д., входит в сферу ответственности врачей общей практики и других врачей и, как правило, осуществляется с учетом заболевания/состояния, подлежащего лечению, состояния отдельного субъекта, места доставки, способа введения и других факторов, известных практикующим врачам. Примеры методов и протоколов, упомянутых
- 20 выше, содержатся в Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

- 25 Может быть введено несколько доз агента. Одна или более, или каждая из доз может сопровождаться одновременным или последовательным введением другого терапевтического агента.

- 30 Несколько доз могут быть разделены заданным интервалом времени, который может быть выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 дня, или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. Например, дозы могут быть введены раз в 7, 14, 21 или 28 дней (плюс или минус 3, 2 или 1 день).

- 35 Для терапевтического применения агенты, способные ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, предпочтительно включают в состав лекарственного средства или фармацевтического препарата вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, включая, не ограничиваясь перечисленным, фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, вспомогательные вещества, разбавители, наполнители, буферы, консерванты, антиоксиданты, смазывающие вещества, стабилизаторы, солюбилизаторы, поверхностно-активные вещества (например, смачивающие агенты), маскирующие агенты, красители, ароматизаторы и
- 40 подсластители.

Термин «фармацевтически приемлемый» в контексте настоящей заявки относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, лекарственным формам и т. д., которые с медицинской точки зрения подходят для применения в контакте с тканями рассматриваемого субъекта (например, человека) и не вызывают чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соотношением польза/риск. Каждый носитель, адъювант, вспомогательное вещество и т. д. также должны быть «приемлемыми» в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата.

Подходящие носители, адъюванты, вспомогательные вещества и т. д. можно найти в стандартных фармацевтических пособиях, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994.

Препараты могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармацевтики. Такие способы включают стадию объединения активного соединения с носителем, который состоит из одного или более дополнительных ингредиентов. Как правило, препараты готовят путем равномерного и тщательного объединения активного соединения с носителями (например, жидкими носителями, тонкоизмельченного твердым носителем и т. д.), а затем, при необходимости, формования продукта.

Препараты могут быть приготовлены для местного, парентерального, системного, внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, интратекального, внутриглазного, внутриконъюнктивального, подкожного, перорального или трансдермального способов введения, которые могут включать инъекцию. Инъекционные препараты могут содержать выбранный агент в стерильной или изотонической среде. Препарат и способ введения могут быть выбраны в соответствии с агентом и заболеванием/состоянием, подлежащим лечению.

Агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, может быть введен для лечения, как описано в настоящей заявке, в сочетании с другими видами лечения заболеваний и состояний, связанных с дисфункцией ГМК. Другие подходящие виды лечения будут известны специалисту в данной области техники. Агент может быть введен по отдельности или в сочетании с другими видами лечения, либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от подлежащего лечению заболевания/состояния. Например, препарат может быть введен до, одновременно или после лечения. Препарат и вид лечения могут быть включены в состав одного препарата, например, препарата, описанного выше, или включены в состав отдельных препаратов.

#### Обнаружение IL-11 и рецепторов IL-11

Некоторые аспекты и варианты реализации настоящего изобретения относятся к обнаружению экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплекса, содержащего IL-11R $\alpha$  и/или gp130) в образце, полученном от субъекта.

В некоторых аспектах и вариантах реализации настоящее изобретение относится к повышению экспрессии (сверхэкспрессии) IL-11 или рецептора IL-11 (в виде белка или олигонуклеотида, кодирующего соответствующий IL-11 или рецептор IL-11) и обнаружению такого повышения в качестве индикатора пригодности для лечения агентом, способным ингибировать действие IL-11, или агентом, способным предотвращать или снижать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.

Повышение экспрессии включает экспрессию на уровне, превышающем уровень, обычно ожидаемый для клетки или ткани данного типа. Повышение может быть определено путем измерения уровня экспрессии релевантного фактора в клетке или ткани. Можно провести сравнение между уровнем экспрессии в образце клетки или ткани от субъекта и референсным уровнем экспрессии для релевантного фактора, например, значением или диапазоном значений, представляющих нормальный уровень экспрессии релевантного фактора для того же самого или соответствующего типа клетки или ткани. В некоторых вариантах реализации референсные уровни могут быть определены путем обнаружения экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 в контрольном образце, например, в соответствующих клетках или ткани от здорового субъекта или из здоровой ткани того же самого субъекта. В некоторых вариантах реализации референсные уровни могут быть получены из стандартной кривой или набора данных.

Уровни экспрессии могут быть определены количественно для абсолютного сравнения, или могут быть сделаны относительные сравнения.

В некоторых вариантах реализации можно считать, что активация IL-11 или рецептора IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплекса, содержащего IL-11R $\alpha$  и/или gp130) имеет место, когда уровень экспрессии в тестируемом образце по меньшей мере в 1,1 раз превышает референсный уровень. Более предпочтительно, уровень экспрессии может быть выбран из по меньшей мере в 1,2, по меньшей мере в 1,3, по меньшей мере в 1,4, по меньшей мере в 1,5, по меньшей мере в 1,6, по меньшей мере в 1,7, по меньшей мере в 1,8, по меньшей мере в 1,9, по меньшей мере в 2,0, по меньшей мере в 2,1, по меньшей мере в 2,2, по меньшей мере в 2,3, по меньшей мере в 2,4 по меньшей мере в 2,5, по меньшей мере в 2,6, по меньшей мере в 2,7, по меньшей мере в 2,8, по меньшей мере в 2,9, по меньшей мере в 3,0, по меньшей мере в 3,5, по меньшей мере в 4,0, по меньшей мере в 5,0, по меньшей мере в 6,0, по меньшей мере в 7,0, по меньшей мере в 8,0, по меньшей мере в 9,0 или по меньшей мере в 10,0 раз превышающего референсный уровень.

Уровни экспрессии могут быть определены одним из ряда известных методов анализа *in vitro*, таких как анализы на основе ПЦР, анализы гибридизации *in situ*, анализы методом проточной цитометрии, иммунологические или иммуногистохимические анализы.

Например, подходящие методики включают способ определения уровня IL-11 или рецептора IL-11 в образце путем приведения образца в контакт с агентом, способным связывать IL-11 или рецептор IL-11, и обнаружения образования комплекса агента и IL-11 или рецептора IL-11. Агент может представлять собой любую подходящую связывающую молекулу, например, антитело,



полипептид, пептид, олигонуклеотид, аптамер или малую молекулу, и может быть необязательно помечен для обеспечения возможности обнаружения, например, визуализации образованных комплексов. Подходящие метки и средства для их обнаружения хорошо известны специалистам в данной области техники и включают флуоресцентные метки (например, флуоресцеин, родамин, эозин и NDB (нитробензоксадиазол), зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), хелаты редкоземельных элементов, таких как европий (Eu), тербий (Tb) ) и самарий (Sm), тетраметилродамин, тexasский красный, 4-метилумбеллиферон, 7-амино-4-метилкумарин,  $Cu_2$ ,  $Cu_5$ ), изотопные маркеры, радиоизотопы (например,  $^{32}P$ ,  $^{33}P$ ,  $^{35}S$ ), хемилюминесцентные метки (например, сложный эфир акридиния, люминол, изолюминол), ферменты (например, пероксидазу, щелочную фосфатазу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, люциферазу), антитела, лиганды и рецепторы. Методики обнаружения хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть выбраны таким образом, чтобы они соответствовали метящему агенту. Подходящие методики включают ПЦР-амплификацию олигонуклеотидных меток, масс-спектрометрию, детекцию флуоресценции или цвета, например, при ферментативном превращении субстрата репортерным белком, или детекцию радиоактивности.

Анализы могут быть разработаны с возможностью определения количества IL-11 или рецептора IL-11 в образце. Количество IL-11 или рецептора IL-11 в тестируемом образце могут быть сравнены с референсными значениями, и сравнение может быть использовано для определения того, содержит ли тестируемый образец количество IL-11 или рецептора IL-11, составляющее меньше или больше референсного значения для выбранного уровня статистической значимости.

Количественное определение обнаруженного IL-11 или рецептора IL-11 может быть использовано для определения активации или подавления или амплификации генов, кодирующих IL-11 или рецептор IL-11. В тех случаях, когда тестируемый образец содержит фиброзные клетки, такую активацию, подавление или амплификацию можно сравнивать с референсным значением, чтобы определить, присутствует ли какая-либо статистически значимая разница.

Образец, полученный от субъекта, может быть любого вида. Биологический образец может быть взят из любой ткани или физиологической жидкости, например образца крови, образца, полученного из крови, образца сыворотки, образца лимфы, образца спермы, образца слюны, образца синовиальной жидкости. Образец, полученный из крови, может представлять собой выделенную фракцию крови пациента, например, выделенную фракцию, содержащую клетки, или фракцию плазмы или сыворотки. Образец может включать образец ткани или биоптат; или клетки, выделенные из субъекта. Образцы могут быть взяты с помощью известных методик, такими как биопсия или аспирация шприцом. Образцы могут храниться и/или обрабатываться для последующего определения уровней экспрессии IL-11.

Образцы могут быть использованы для определения активации IL-11 или рецептора IL-11 у субъекта, у которого был взят образец.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации образец может представлять собой образец ткани, например, биоптат, взятый из сосудистой или сердечной ткани, ткани внутреннего органа или ткани органа дыхательной системы. Образец может содержать клетки и предпочтительно может содержать гладкомышечные клетки (ГМК).

5

Субъект может быть выбран для терапии/профилактики в соответствии с настоящим изобретением на основании определения, что у субъекта повышен уровень экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 (например, IL-11R, gp130 или комплекса, содержащего IL-11R $\alpha$  и/или gp130).

Нерегулируемая экспрессия IL-11 или рецептора IL-11 может служить маркером заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены ГМК, подходящего для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

Активация может осуществляться в данной ткани или в отдельных клетках данной ткани. Предпочтительной тканью может быть сосудистая или сердечная ткань, ткань внутреннего органа или ткань органа дыхательной системы. Предпочтительным типом клеток могут быть ГМК. Повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 может также быть определено в циркулирующей жидкости, например, в крови, или в образце, полученном из крови. Активация может осуществляться в отношении внеклеточного IL-11 или IL-11R $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации экспрессия может быть повышена локально или системно.

20

После отбора субъекту может быть введен агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

#### Диагностика и прогноз

Выявление повышения экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплекса, содержащего IL-11R $\alpha$  и/или gp130) также может быть использовано в способе диагностики заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК, идентификации субъекта с риском развития такого заболевания/состояния, и в способах прогнозирования или предсказания ответа субъекта на лечение агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

30

В некоторых вариантах реализации у субъекта может быть подозрение на наличие заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК, например, на основании наличия других симптомов, свидетельствующих о таком заболевании/состоянии в организме субъекта или в отдельных клетках/тканях организма субъекта, или субъект может считаться подверженным риску развития заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК, например, из-за генетической предрасположенности или воздействия внешних условий, которые, как известно, являются факторами риска для развития такого заболевания/состояния. Определение повышения экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 может подтвердить диагноз или предполагаемый диагноз, или может подтвердить, что субъект подвержен риску развития заболевания/состояния. Посредством определения также возможно

40

диагностировать состояние или предрасположенность как подходящие для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

Таким образом, может быть предложен способ обеспечения прогноза для субъекта, имеющего или подозреваемого на наличие заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК, причем способ включает определение, повышена ли экспрессия IL-11 или рецептора IL-11 в образце, полученном от указанного субъекта, и на основании определения -  
5 обеспечение прогноза лечения указанного субъекта агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

В некоторых аспектах способы диагностики или способы прогнозирования или предсказания ответа субъекта на лечение агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу  
10 сигналов, могут не требовать определения экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, а могут основываться на определении генетических факторов у субъекта, которые являются прогностическими факторами повышения экспрессии или активности. Такие генетические факторы могут включать определение генетических мутаций, однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) или амплификации генов в IL-11, IL-11R $\alpha$  и/или gp130, которые коррелируют с и/или  
15 позволяют прогнозировать повышение экспрессии или активности, и/или опосредованной IL-11 передачи сигналов. Использование генетических факторов для прогнозирования предрасположенности к патологическому состоянию или ответа на лечение известно в данной области техники, см., например, см. Peter Stärkel *Gut* 2008;57:440-442; Wright et al., *Mol. Cell. Biol.* март 2010 г., vol. 30 no. 6 1411-1420.

20 Генетические факторы могут быть анализированы способами, известными специалистам в данной области техники, включая анализы на основе ПЦР, например, количественную ПЦР, конкурентную ПЦР. Посредством определения наличия генетических факторов, например, в образце, полученном от субъекта, возможно подтвердить диагноз, и/или классифицировать субъекта как  
25 подверженного риску развития заболевания/состояния, и/или идентифицировать субъекта как подходящего для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

Некоторые способы могут включать определение наличия одного или более ОНП, связанных с  
30 секрецией IL-11, или предрасположенности к развитию заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК. ОНП обычно являются биаллельными и, следовательно, могут быть легко определены с использованием одного из ряда обычных анализов, известных специалистам в данной области техники (см., например, см. Anthony J. Brookes. *The essence of SNPs. Gene* Volume 234, Issue 2, 8 July 1999, 177-186; Fan et al., *Highly*  
35 *Parallel SNP Genotyping. Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2003. 68: 69-78; Matsuzaki et al., *Parallel Genotyping of Over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. Genome Res.* 2004. 14: 414-425).

Способы могут включать определение того, какой аллель ОНП присутствует в образце,  
40 полученном от субъекта. В некоторых вариантах реализации определение наличия минорного

аллеля может быть связано с повышенной секрецией IL-11 или предрасположенностью к развитию заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.

Соответственно, в одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ скрининга субъекта, включающий:

- 5                   получение образца нуклеиновой кислоты от указанного субъекта;  
                 определение того, какой аллель присутствует в указанном образце в положении  
                 полиморфного нуклеотида одного или более из ОНП, перечисленных на фиг. 33, фиг. 34  
                 или фиг. 35 заявки WO 2017/103108 A1 (включенной в настоящую заявку посредством  
10                  ссылки), или ОНП в неравновесном сцеплении с одним из перечисленных ОНП с  $r^2 \geq 0,8$ .

Стадия определения может включать определение, присутствует ли минорный аллель в образце в выбранном положении полиморфного нуклеотида. Оно может включать определение, присутствует ли 0, 1 или 2 минорных аллелей.

- 15                  Способ скрининга может быть или являться частью способа определения предрасположенности субъекта к развитию заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК, или способа диагностики или прогнозирования, как описано в настоящей заявке.

- 20                  Способ может дополнительно включать стадию идентификации субъекта как имеющего предрасположенность или повышенный риск развития заболевания/состояния, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК, например, если у субъекта определено наличие минорного аллеля в положении полиморфного нуклеотида. Способ может дополнительно  
25                  включать стадию выбора субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и/или введения субъекту агента, способного ингибировать опосредованного IL-11 передачу сигналов, для обеспечения лечения  
30                  заболевания/состояния у субъекта или для предупреждения развития или прогрессирования заболевания/состояния у субъекта.

- 30                  ОНП, которые могут быть определены, включают один или более SNP, перечисленных на фиг. 33, фиг. 34 или фиг. 35 заявки WO 2017/103108 A1 (включенной в настоящую заявку посредством  
35                  ссылки) В некоторых вариантах реализации способ может включать определение одного или более ОНП, перечисленных на фиг. 33 заявки WO 2017/103108 A1. В некоторых вариантах реализации способ может включать определение одного или более ОНП, перечисленных на фиг. 34 заявки WO 2017/103108 A1. В некоторых вариантах реализации способ может включать  
40                  определение одного или более ОНП, перечисленных на фиг. 35 заявки WO 2017/103108 A1. ОНП могут быть выбраны для определения как имеющие низкое P-значение или FDR (уровень ложноположительных результатов).

- 40                  В некоторых вариантах реализации ОНП выбирают в качестве хороших прогностических параметров ответа на лечение против IL-11 на основе регуляции VSTstim (стабилизация

дисперсии в стимулированных клетках) в *транс* (фиг. 33 заявки WO 2017/103108 A1). В некоторых вариантах реализации способ может включать определение того, какой аллель присутствует для одного или более из следующих ОНП: rs10831850, rs4756936, rs6485827, rs7120273 и rs895468. В некоторых вариантах реализации ОНП выбирают в качестве хороших прогностических параметров ответа на лечение против IL-11 на основе регуляции VSTstim-VSTunstim (стабилизация дисперсии в нестимулированных клетках) в *сис* (фиг. 34 заявки WO 2017/103108 A1).

В некоторых вариантах реализации ОНП выбирают в качестве хороших прогностических параметров ответа на лечение против IL-11 на основе регуляции VSTstim-VSTunstim в *транс* (фиг. 35 заявки WO 2017/103108 A1). В некоторых вариантах реализации способ может включать определение того, какой аллель присутствует для одного или более из следующих ОНП: rs7120273, rs10831850, rs4756936, rs6485827 (фиг. 35 заявки WO 2017/103108 A1).

ОНП: rs7120273, rs10831850, rs4756936, rs6485827 находятся в сильном неравновесном сцеплении (LD) друг с другом на 11 хромосоме (в так называемом блоке LD), и поэтому очень часто наследуются совместно.

Квадрат корреляции частот генов ( $r^2$ ) отражает степень неравновесности сцепления (LD) между двумя ОНП. Из-за LD между ОНП в локальных и, следовательно, совместно наследуемых областях генома генотип данного ОНП может быть выведен путем определения генотипа меченого/проксимального ОНП. Порог отсечения LD, используемый в данной области техники для идентификации парных меченых/проксимальных ОНП, составляет значение  $r^2$ , равное 0,8 (Wang et al. 2005, Nat. Rev. Genet. 6(2): 109-18; Barrett et al. 2006, Nat Genet., 38 (6): 659-662). Таким образом, можно определить генотип отдельно взятого ОНП, определив генотип меченого/проксимального ОНП в неравновесном сцеплении со значением  $r^2 \geq 0,8$ .

Нуклеотидную последовательность ОНП обозначают с использованием числа «rs». Полная последовательность доступна в базе данных однонуклеотидных полиморфизмов (dbSNP) Национального центра биотехнологической информации (NCBI), доступной по адресу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

Способы диагностики или прогнозирования могут быть осуществлены *in vitro* на образце, полученном от субъекта, или после обработки образца, полученного от субъекта. После взятия образца присутствие пациента для проведения способа диагностики или прогнозирования *in vitro* не требуется, и, следовательно, способ может не осуществляться в отношении организма человека или животного.

Другие диагностические или прогностические тесты могут быть использованы в сочетании с описанными в настоящей заявке, чтобы повысить точность диагноза или прогноза или подтвердить результат, полученный с помощью тестов, описанных в настоящей заявке.

Субъекты

Субъекты могут представлять собой животных или людей. Субъекты предпочтительно представляют собой млекопитающих, более предпочтительно людей. Субъект может представлять собой млекопитающее, отличное от человека, но более предпочтительно представляет собой человека. Субъект может быть мужского или женского пола. Субъект может представлять собой пациента. Пациент может иметь заболевание/состояние, как описано в настоящей заявке. У субъекта может быть диагностировано заболевание/состояние, требующее лечения, у него может быть подозрение на наличие такого заболевания/состояния, или он может быть подвержен риску развития такого заболевания/состояния.

В вариантах реализации согласно настоящему изобретению субъект предпочтительно представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации субъект, подлежащий лечению в соответствии с терапевтическим или профилактическим способом согласно изобретению, представляет собой субъекта, имеющего рак или подверженного риску его развития. В вариантах реализации согласно настоящему изобретению субъект может быть выбран для лечения в соответствии со способами, основанными на получении характеристики определенных маркеров такого заболевания/расстройства/состояния. У субъекта может быть диагностировано заболевание или расстройство, требующее лечения, или у него может быть подозрение на наличие такого заболевания/расстройства/состояния.

Идентичность последовательностей

Попарное и множественное выравнивание последовательностей для целей определения процента идентичности между двумя или более последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот может быть достигнуто различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение ClustalOmega (Söding, J. 2005, Bioinformatics 21, 951-960), T-coffee (Notredame et al. 2000, J. Mol. Biol. (2000) 302, 205-217), Kalign (Lassmann and Sonnhammer 2005, BMC Bioinformatics, 6(298)) и MAFFT (Katoh and Standley 2013, Molecular Biology and Evolution, 30(4) 772–780. При использовании такого программного обеспечения предпочтительно используют параметры по умолчанию, например, для штрафа за гэп и штрафа за удлинение.

Последовательности

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	Человеческий IL-11 (UniProt P20809)	MNCVCRLVLVLSLWPDТАVAPGPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLADTRQLAAQLRD KFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHVQWLRRAGGSSSLKTLEP ELGTLQARLDRLRLQLLMSRLALPQPPDPAPPPLAPPSSAWGGIRAAHAILGGLHLTLDW AVRGLLLLKTRL
2	Человеческий gp130 (UniProt P40189-1)	MLTLQTWLVQALFIFLTTTESTGELLDPGYSPEPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYFHVNANY IWWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFGQLEQNVYGITIISGLPPEKPKNL SCIVNEGKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSTVDYSTVYFVNI EWWWAEANALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQ YRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITY EDRPSKAPSFYWKIDPSHTQGYRTVQLVWKTLPPEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNA TKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKNMLWVEWTTPR ESVKKYILEWCVLSDKAPCIDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESI

		KAYLKQAPPSKGPTVRTKKV/GKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETA VNVDS HTEYTLSSLTSDTL YMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGV LFCFNKRDLIKKHIWPNVDPSPKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKQDQMYSDGNFTDVSVEIEAND KKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSDENESSQNTSSTVQYSTV HSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGLPRQYFKQNCQSHE SPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMCMFQEVSAADAFGPGTEGQVE RFETVGM EAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ
3	Человеческий IL11RA (UniProt Q14626)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCQAWGPPGVQYGGPGRSVKLCPCGVTAGDPVSWF RDGEPKLLQGPDSGLGHELVLQAADSTDEGTICQTLGDALGGTVTLQLGYPPARPVVSCQA ADYENFSC TWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVH GAEFWSQYRINVTENPLGASTRLLDVSLSILRPDPPQGLRVESVPGYPRRLRASWTYPAS WPCQPHFLLKFRLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEEVITDAVAGLPHAVRVSARDFLDAGTWST WSPEAWGTPSTGTIPKEIPAWGQLHTQPEVEPQVDS PAPP RP SLQPHPRLLDHRDSVEQVA VLASLGLSFLGLVAGALALGLWLRRLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL
4	Hyper-IL-11 (слияние IL- 11RA:IL-11)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCQAWGPPGVQYGGPGRSVKLCPCGVTAGDPVSWF RDGEPKLLQGPDSGLGHELVLQAADSTDEGTICQTLGDALGGTVTLQLGYPPARPVVSCQA ADYENFSC TWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVH GAEFWSQYRINVTENPLGASTRLLDVSLSILRPDPPQGLRVESVPGYPRRLRASWTYPAS WPCQPHFLLKFRLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEEVITDAVAGLPHAVRVSARDFLDAGTWST WSPEAWGTPSTGPAGQSGGGGGSGGGSGGGSVPGPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSL LADTRQLAAQLRDKFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQPLGVLTRLRADLLSYLRHVQWL RRAGGSSKLTLEPELGTQARLDRLRLRLQLLMSRLALPQPPDPPAPPLAPPSSAWGGIRAA HAILGGLHLTLDWAVRGLLLKTRL
5	Линкер из 20 аминокислот	GPAGQSGGGGGSGGGSGGGSV
6	миРНК мишень IL-11	CCTTCAAAGCCAGATCTT
7	миРНК мишень IL-11	GCCTGGGCAGGAACATATA
8	миРНК мишень IL-11	CCTGGGCAGGAACATATAT
9	миРНК мишень IL-11	GGTTCATTATGGCTGTGTT
10	миРНК мишень IL-11R $\alpha$	GGACCATAACAAAGGAGAT
11	миРНК мишень IL-11R $\alpha$	GCGTCTTTGGGAATCCTTT
12	миРНК мишень IL-11R $\alpha$	GCAGGACAGTAGATCCCT
13	миРНК мишень IL-11R $\alpha$	GCTCAAGGAACGTGTGTAA
14	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	CCUUCCAAAGCCAGAUCUUdTdT-AAGAUCUGGCUUUGGAAGGdTdT
15	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	GCCUGGGCAGGAACAUAUAdTdT-UAUAUGUUCUGCCCAGGCdTdT
16	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	CCUGGGCAGGAACAUAUAdTdT-UAUAUGUUCUGCCCAGGCdTdT
17	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	GGUUCAUUAUGGUGUGUUdTdT-AACACAGCCAUAUAUGAACdTdT
18	миРНК к IL-11R $\alpha$ (U32324.1)	GGACCAUACCAAAGGAGAUdTdT-AUCUCCUUUGGUAUGGUCCdTdT
19	миРНК к IL-11R $\alpha$ (U32324.1)	GCGUCUUUGGAAUCCUUdTdT-AAAGGAUCCCAAAGACGCdTdT
20	миРНК к IL-11R $\alpha$ (U32324.1)	GCAGGACAGUAGAUCUUAdTdT-UAGGGAUCUACUGUCCUGCdTdT
21	миРНК к IL-11R $\alpha$ (U32324.1)	GCUCAAGGAACGUGUGUAAdTdT-UUACACACGUUCUUGAGCdTdT

### Пронумерованные заявления

В следующих пронумерованных абзацах (абз.) описаны частные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения:



1. Агент, способный ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения в способе лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК).
- 5 2. Применение агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения для производства лекарственного средства для применения в способе лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК).
- 10 3. Способ лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.
- 15 4. Агент для применения в способе согласно абз. 1, применение согласно абз. 2 или способ согласно абз. 3, где заболевание представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.
- 20 5. Агент для применения, применение или способ согласно любому из абз. 1-4, где агент представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11.
6. Агент для применения, применение или способ согласно абз. 5, агент выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
- 25 7. Агент для применения, применение или способ согласно абз. 6, где агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
8. Агент для применения, применение или способ согласно абз. 6, где агент представляет собой рецептор-ловушку IL-11.
- 30 9. Агент для применения, применение или способ согласно любому из абз. 1-4, где агент способен снижать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.
- 35 10. Агент для применения, применение или способ согласно абз. 9, где агент представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
- 40 11. Агент для применения, применение или способ согласно любому из абз. 1-10, где заболевание представляет собой заболевание сердечно-сосудистой системы, пищеварительной системы, выделительной системы, дыхательной системы, почечной системы или репродуктивной системы.

12. Агент для применения, применение или способ согласно любому из абз. 1-11, где заболевание выбрано из группы, состоящей из атеросклероза, гипертензии, сосудистой аневризмы, синдрома Марфана, аневризмы аорты, синдрома Фурлонга, синдрома Сфринтцена-  
5 Голдберга, синдрома Луиса-Дитца, семейного синдрома аневризмы грудного отдела аорты, синдрома извитости артерий, аневризмы сосудов головного мозга, стеноза и рестеноза сосудов, атеросклероза, фиброзно-мышечной дисплазии (ФМД), надклапанного стеноза, стеноза почечной артерии, легочной артериальной гипертензии (ЛАГ), плексиформных поражений, фиброзно-  
10 мышечной дисплазии, телеангиэктазии, ахалазии, дисфагии, диареи, запора, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), стриктуры кишечника, стеноза привратника, целиакии, синдрома раздраженного кишечника, дивертикулита, болезни Крона, язвенного колита, заболевания почечной системы, фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС), IgA-нефропатии, серповидного гломерулонефрита, волчаночного нефрита, диабетической нефропатии (ДН),  
15 болезни мочевого пузыря, болезни легких, астмы, муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), системного склероза и синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS).

13. Агент для применения, применение или способ согласно любому из абз. 1-12, где способ лечения или предупреждения включает введение агента субъекту, у которого повышена  
20 экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.

14. Агент для применения, применение или способ согласно любому из абз. 1-13, где способ лечения или предупреждения включает введение агента субъекту, у которого, как было  
25 определено, повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.

15. Агент для применения, применение или способ согласно любому из абз. 1-14, где способ лечения или предупреждения включает определение того, повышена ли экспрессия IL-11 или  
30 рецептора IL-11 у субъекта, и введение агента субъекту, у которого повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.

16. Применение агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК).

17. Способ ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК), включающий  
35 приведение ГМК в контакт с агентом, способным ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

18. Способ ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК) у субъекта, включающий  
40 введение указанному субъекту агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

19. Применение или способ согласно любому из абз. 16-18, где ГМК представляют собой секреторные ГМК.
20. Применение или способ согласно любому из абз. 16-19, где агент представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11.
21. Применение или способ согласно любому из абз. 16-20, агент выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
22. Применение или способ согласно любому из абз. 16-21, где агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
23. Применение или способ согласно любому из абз. 16-21, где агент представляет собой рецептор-ловушку IL-11.
24. Применение или способ согласно любому из абз. 16-21, где агент способен снижать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.
25. Применение или способ согласно любому из абз. 16-21, где агент представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
26. Способ определения пригодности субъекта для лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), с помощью агента, способного ингибировать действие интерлейкина-11 (IL-11), где способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли у указанного субъекта экспрессия IL-11 или рецептора интерлейкина-11 (IL-11R).
27. Способ выбора субъекта для лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), с помощью агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли у указанного субъекта экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.
28. Способ диагностики заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или риска развития заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК, у субъекта, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышения экспрессии интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 в образце, полученном от указанного субъекта.

29. Способ согласно абз. 28, представляющий собой способ подтверждения диагноза заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК, у субъекта с подозрением на наличие заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК.
- 5 30. Способ согласно абз. 28 или абз. 29, дополнительно включающий выбор субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.
31. Способ согласно любому из абз. 26-30, где заболевание представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.
- 10 32. Способ обеспечения прогноза для субъекта, имеющего заболевание, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или с подозрением на его наличие, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 в образце, полученном от указанного субъекта, и, на основании
- 15 определения, обеспечение прогноза лечения субъекта агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.
33. Способ согласно абз. 32, дополнительно включающий выбор субъекта, у которого, как было определено, повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11, для лечения агентом,
- 20 способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.
34. Способ диагностики заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или риска развития заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК, у субъекта, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более
- 25 генетических факторов у указанного субъекта, позволяющих прогнозировать повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или повышение опосредованной IL-11 передачи сигналов.
35. Способ согласно абз. 34, представляющий собой способ подтверждения диагноза заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), у субъекта с
- 30 подозрением на наличие заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК.
36. Способ согласно абз. 34 или абз. 35, дополнительно включающий выбор субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.
- 35 37. Способ обеспечения прогноза для субъекта, имеющего заболевание, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или с подозрением на его наличие, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более генетических факторов у
- 40 указанного субъекта, позволяющих прогнозировать повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или повышение опосредованной IL-11 передачи сигналов.

38. Способ согласно любому из абз. 32-37, где заболевание представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.

\*\*\*

5 Изобретение включает в себя комбинацию описанных аспектов и предпочтительных признаков, за исключением случаев, когда такая комбинация явно недопустима или прямо исключена.

Заголовки разделов, используемые в настоящей заявке, предназначены только для целей упорядочения и не должны рассматриваться как ограничивающие описанный объект.

10 Аспекты и варианты реализации настоящего изобретения далее проиллюстрированы в качестве примера со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Дополнительные аспекты и варианты реализации будут понятны для специалистов в данной области техники. Все документы, упомянутые в данном тексте, включены в настоящую заявку посредством ссылки.

15 Во всем тексте описания, включая нижеследующую формулу изобретения, если контекст явно не требует иного, слово «содержать» и его вариации, такие как «содержит» и «содержащий», будут подразумевать включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключая любое другое целое число или стадию, или группу целых чисел или  
20 стадий.

Необходимо отметить, что в контексте описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Диапазоны могут быть выражены в настоящем описании в виде от «приблизительно» одного  
25 конкретного значения и/или до «приблизительно» другого конкретного значения. При таком обозначении диапазона другой вариант реализации включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, если значения выражены в виде приближений при помощи предшествующего термина «приблизительно», то следует понимать, что конкретное значение составляет другой вариант реализации.

30 Раскрытые в настоящей заявке способы могут быть осуществлены, или продукты могут присутствовать, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Подразумевается, что термин «*in vitro*» охватывает экспериментов с материалами, биологическими веществами, клетками и/или тканями в лабораторных условиях или в культуре, тогда как в отношении термина «*in vivo*» подразумевается,  
35 что он охватывает эксперименты и процедуры с интактными многоклеточными организмами. «*Ex vivo*» относится к чему-либо, присутствующему или происходящему вне организма, например вне организма человека или животного, например, на ткани (например, целых органах) или клетках, взятых из организма.

40 В местах настоящей заявки, где раскрыта последовательность нуклеиновой кислоты, также прямо рассматривается ее обратный комплемент.

### Краткое описание графических материалов

Варианты реализации и эксперименты, иллюстрирующие принципы изобретения, далее обсуждаются со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

5

**Фигура 1.** Гистограмма, демонстрирующая секвенирование РНК человеческих СГМК на исходном уровне. Столбцы обозначают количество чтений, сгенерированных на образец ( $n = 17$ ). Для анализа экспрессии РНК в масштабе всего генома для первичных СГМК было сгенерировано в общей сложности около 20 миллионов чтений.

10

**Фигура 2.** График, демонстрирующий результаты анализа основных компонентов уровней транскриптов данных секвенирования РНК из первичных человеческих СГМК, полученных из АВ ( $n = 6$ ) и LIMA ( $n = 11$ ), фибробластов предсердий (FIB;  $n = 84$ ) и эндотелиальных клеток (EC;  $n = 17$ ).

15

**Фигуры 3А-3D.** Графики, демонстрирующие экспрессию РНК (**3А**) CD31 (маркер EC), (**3В**) TNY-1 (маркер фибробластов), (**3С**) эластина и (**3D**) фибулина (маркеры СГМК) согласно результатам анализа секвенирования РНК [U-критерий манна-уитни, 2-сторонний; медиана, 10–90-й процентиль].

20

**Фигура 4.** Иллюстративные микроскопические изображения первичных человеческих СГМК, фибробластов предсердий и эндотелиальных клеток в культуре. Белая полоска соответствует 100 мкм.

25

**Фигура 5.** Гистограмма, демонстрирующая секвенирование РНК человеческих СГМК, стимулированных TGF $\beta$ 1. Столбцы обозначают количество чтений, сгенерированных на образец ( $n = 14$ ). Для анализа экспрессии РНК в масштабе всего генома было сгенерировано в общей сложности около 20 миллионов чтений.

30

**Фигуры 6А-6D.** Графики и диаграммы, демонстрирующие отличительные черты экспрессии РНК нестимулированных и стимулированных посредством TGF $\beta$ 1 человеческих СГМК из АВ и LIMA. (**6А** и **6В**) MA-графики, демонстрирующие DEseq263-скорректированные log<sub>2</sub>-кратные изменения по сравнению со средним нормированного числа чтений в АВ и LIMA, соответственно. (**6С** и **6D**) графическое представление всех генов, активированных ( $FC > 1$ ) в ответ на стимуляцию посредством TGF $\beta$ 1 СГМК из АВ и LIMA, и их геномного положения в хромосоме. IL-11 выделен.

35

**Фигура 7.** Гистограмма, демонстрирующая вызванную TGF $\beta$ 1 активацию секреции IL-11 СГМК. СГМК не стимулировали или инкубировали с TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл, 24 ч), и собранный супернатант анализировали с помощью ELISA для определения уровня IL-11 ( $n = 3$ ). Данные выражены как среднее значение  $\pm$  СКО,  $P < 0,01$  с помощью двустороннего парного выборочного Т-критерия.

40

**Фигура 8.** График, демонстрирующий экспрессию рецептора IL-11 (IL-11RA) и рецептора IL-6 (IL-6R) более чем в 500 типах клеток. Большими кружками обозначена экспрессия рецептора IL-11 гладкомышечными клетками.

5 **Фигура 9.** График, демонстрирующий, что гипер IL-11 не детектируется с помощью ELISA на IL-11. Рекомбинантный гипер IL11 добавляли в лунки планшета для ELISA в различных концентрациях и затем измеряли с использованием коммерчески доступного ELISA для определения IL-11.

10 **Фигура 10.** Гистограмма, демонстрирующая, что гипер IL-11 вызывает секрецию IL-11 СГМК. СГМК инкубировали с возрастающими дозами гипер IL-11 и в конце эксперимента анализировали супернатант клеточной культуры на IL-11 в 2 параллельных биологических анализах. Данные выражены как среднее  $\pm$  СКО, сравнение с помощью одностороннего ANOVA с множественным сравнением по Даннетту. \* =  $P < 0,05$ .

15 **Фигура 11.** График, демонстрирующий отличительные черты экспрессии РНК нестимулированных и стимулированных посредством IL-11 человеческих СГМК из АВ и LIMA. Анализ основан на объединенных биологических параллельных анализах СГМК АВ ( $n = 7$ ) и СГМК LIMA ( $n = 11$ ). MA-график демонстрирует DEseq263-скорректированные  $\log_2$ -кратные изменения по сравнению со средним нормированного числа чтений.

20

**Фигуры 12A-12E.** Графики и фотографии, демонстрирующие влияние стимуляции посредством TGF $\beta$ 1 и IL-11 на экспрессию маркеров сократительного и секреторного фенотипов СГМК. СГМК не стимулировали или культивировали в присутствии TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл, 24 ч) или IL-11 (5 нг/мл, 24 ч).  
 25 Клетки анализировали с помощью флуоресценции и автоматического количественного анализа изображений в 4 параллельных биологических анализах. **(12A)** Процент SM22 $\alpha$ -положительных клеток. **(12B)** Интенсивность иммуноокрашивания миокардина. **(12C)** Интенсивность иммуноокрашивания коллагена I. **(12D)** Содержание коллагена I в супернатанте клеточной культуры, определенное с использованием анализа общего коллагена с помощью Sirius Red в 5  
 30 параллельных биологических анализах. **(12E)** Иллюстративные изображения флуоресценции высокого разрешения после обработки СГМК посредством TGF $\beta$ 1 и IL-11. Иммуноокрашивание на ядра (DAPI), коллаген 1 (Col I) и F-актин (родамин) свидетельствуют о том, что как TGF $\beta$ 1, так и IL-11 активируют секреторный фенотип СГМК с повышенной экспрессией коллагена. Белая полоска соответствует 200 мкм. Все данные выражены как среднее  $\pm$  СКО, и статистическая значимость  
 35 проанализирована с помощью одностороннего ANOVA с множественными сравнениями по Даннетту.

**Фигуры 13A и 13B.** Фотографии **(13A)** и гистограмма **(13B)**, демонстрирующие влияние IL-11 и TGF $\beta$ 1 на миграцию СГМК в анализе заживления ран *in vitro*. Анализы методом «царапин» на  
 40 ранах проводили с помощью конфлюэнтных монослоев СГМК. После синхронизации клеток культуральной средой с низким содержанием сыворотки (M231, содержащей 0,2% FBS) в течение

24 часов создавали линейную царапину с помощью наконечника стерильной пипетки, и клетки либо не обрабатывали (исходный уровень), либо обрабатывали IL-11 (5 нг/мл) либо TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл) в течение 24 часов. Площадь раны визуализировали в 0 часов (верхние секции) и 24 часа (нижние секции), и рассчитывали миграцию с использованием программного обеспечения ImageJ.

5 Все данные выражены как среднее  $\pm$  СКО. Статистическая значимость была установлена с помощью одностороннего ANOVA с множественными сравнениями по Даннетту.

**Фигуры 14А и 14В.** Фотографии (14А) и график (14В), демонстрирующие влияние IL-11 и TGF $\beta$ 1 на миграцию СГМК в анализе в камере Бойдена. Через 24 часа анализировали миграцию СГМК по направлению к лункам, содержащим среду для культивирования клеток без добавок (исходный уровень), или среду, содержащую либо IL-11 (5 нг/мл), либо TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл). Символы на линиях обозначают параллельные биологические анализы.

10

**Фигуры 15А-15С.** Графики, демонстрирующие влияние нейтрализации опосредованной IL-11 передачи сигналов на опосредованную TGF $\beta$ 1 стимуляцию экспрессии маркеров сократительного и секреторного фенотипов СГМК. СГМК не стимулировали или культивировали в присутствии TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл, 24 ч) в присутствии или в отсутствие контрольного антитела IgG или нейтрализующего антитела к IL-11 (2 мкг/мл). (15А) Процент EdU-положительных клеток. (15В) Интенсивность иммуноокрашивания коллагена I. (15С) Содержание коллагена I в супернатанте

15

20

клеточной культуры, определенное с использованием анализа общего коллагена с помощью Sirius Red в 5 параллельных биологических анализах. Все данные выражены как среднее  $\pm$  СКО, статистическая значимость была определена с помощью одностороннего ANOVA с множественными сравнениями по Даннетту.

**Фигуры 16А и 16В.** Фотографии (16А) и гистограмма (16В), демонстрирующие влияние IL-11 и TGF $\beta$ 1 на миграцию СГМК в анализе заживления ран *in vitro*. Анализы методом «царапин» на ранах проводили с помощью конфлюэнтных монослоев СГМК. После синхронизации клеток культуральной средой с низким содержанием сыворотки (M231, содержащей 0,2% FBS) в течение 24 часов создавали линейную царапину с помощью наконечника стерильной пипетки, и клетки либо не обрабатывали (исходный уровень), либо обрабатывали TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл) в течение 24 часов, в присутствии или в отсутствие контрольного антитела IgG или нейтрализующего антитела к IL-11 (2 мкг/мл). Площадь раны визуализировали в 0 часов (верхние секции) и 24 часа (нижние секции), и рассчитывали миграцию с использованием программного обеспечения ImageJ. Все

25

30

35

данные выражены как среднее  $\pm$  СКО. Статистическая значимость была установлена с помощью одностороннего ANOVA с множественными сравнениями по Даннетту. Закрашенные символы обозначают обработку контрольным IgG, а незакрашенные символы обозначают обработку антителом к IL-11. Символы обозначают параллельные биологические анализы. Все данные выражены как среднее  $\pm$  СКО. Статистическую значимость определяли с помощью одностороннего ANOVA с множественными сравнениями по критерию Холма-Сидака.



- Фигура 17.** Микрофотографии криосрезов толстой кишки от мышей с репортером Col1a1-GFP, получавших IL-11 или PBS. Верхний ряд: иллюстративные изображения от мышей, получавших PBS (n = 3). Нижний ряд: иллюстративные изображения от мышей, получавших рекомбинантный мышинный IL-11 (n = 4). Слева: Col1a1 и окрашивание ядер с помощью DAPI. В середине: иммунофлуоресценция для  $\alpha$ SMA, Col1a1 и окрашивание ядер с помощью DAPI. Справа: изображения, демонстрирующие экспрессию  $\alpha$ SMA; полосы демонстрируют увеличенную толщину комбинированных гладкомышечных слоев у животных, получавших IL-11. Масштабная полоска = 100 мкм.
- 5
- 10 **Фигуры 18A-18E.** Влияние повышенной экспрессии IL-11 на патологию ГМК в сердце. Вызванная тамоксифеном Cre-опосредованная сверхэкспрессия IL-11 в мышиных ГМК (SMRS) демонстрирует повышенную экспрессию белка IL-11 в сердце (**18A**) и повышенное отношение массы сердца к массе тела (HW/BW) (**18B**) по сравнению с контрольными животными SMWT. Срезы сердечной ткани от мышей SMRS, окрашенные методом трихром по Массону, демонстрируют
- 15 периваскулярный фиброз по сравнению с контрольными животными SMWT (**18C**). Желудочки мышей SMRS демонстрируют повышенную экспрессию коллагена по сравнению с контрольными животными SMWT (**18D**; \*\*, \*\*\*\* обозначает  $P < 0,01$  и  $P < 0,0001$ , соответственно). Сверхэкспрессия IL-11 вызывает повышенную экспрессию компонентов ВКМ и воспалительных генов в ГМК сердца (**18E**): левые столбцы представляют собой контрольных животных SMWT,
- 20 правые столбцы представляют собой мышей SMRS, сверхэкспрессирующих IL-11. \*, \*\*, \*\*\* обозначает  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ , соответственно.
- Фигуры 19A-19D.** Графики, демонстрирующие влияние повышенной экспрессии IL-11 на размер и функцию сердца. Мыши SMRS имеют меньшую массу тела (**19A**) и массу левого желудочка (ЛЖ) (**19B**) по сравнению с контрольными животными SMWT, но демонстрируют повышенное отношение массы ЛЖ при поправке на массы тела (**19C**). Диаметр левого предсердия (ЛП) увеличен у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными (**19D**). \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $p < 0,001$  и  $P < 0,0001$ , соответственно.
- 25
- 30 **Фигуры 20A-20C.** Графики, демонстрирующие, что толщина передней стенки (**20A**), внутренний диаметр ЛЖ (**20B**) и толщина задней стенки ЛЖ (**20C**) в конце диастолы увеличены у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $p < 0,001$  и  $P < 0,0001$ , соответственно.
- 35 **Фигуры 21A-21D.** Графики, демонстрирующие, что толщина передней стенки (**21A**), внутренний диаметр ЛЖ (**21B**) и толщина задней стенки ЛЖ (**21C**) в конце систолы увеличены у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT. Фракция выброса сохраняется у мышей SMRS (**21D**). \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $p < 0,001$  и  $P < 0,0001$ , соответственно.
- 40 **Фигуры 22A-22E.** Экспрессия IL-11 при ремоделировании ГМК аорты. Экспрессия белка IL-11 повышена в проксимальном отделе грудной аорты у мышей SMRS по сравнению с контрольными

животными SMWT (22A). Внутренний диаметр корня аорты, измеренный в конце диастолы (22B) и конце систолы (22C) с поправкой на массу тела, больше у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT. Внутренний диаметр восходящего отдела аорты в конце систолы с поправкой на массу тела больше у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT (22D). У мышей SMRS сохранялась максимальная скорость потока в аорте по сравнению с контрольными животными (22E). \*\*, \*\*\*\* обозначают  $P < 0,05$  и  $P < 0,0001$ , соответственно.

10 **Фигуры 23A-23D.** Влияние повышенной экспрессии IL-11 на патологию ГМК в легком. У мышей SMRS наблюдается повышенная экспрессия белка IL-11 в легких (23A), повышенные отношения массы легких к массе тела (23B) и повышенная экспрессия коллагена в легких при поправке на отношение массы легких к массе тела (LW/BW) (23C) по сравнению с контрольными животными SMWT. На фигуре 23D показано, что легкие мышей SMRS демонстрируют усиление фиброза легких и инфильтрацию клеточным инфильтратом по сравнению с контрольными животными SMWT в двух иллюстративных примерах.

20 **Фигура 24.** График, демонстрирующий, что мыши SMRS обладают повышенной экспрессией внеклеточного матрикса и воспалительных генов в легких. Левые столбцы представляют собой контрольных животных SMWT, правые столбцы представляют собой мышей SMRS со сверхэкспрессией IL-11. \*\*, \*\*\* обозначают  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ , соответственно.

25 **Фигуры 25A-25C.** Влияние повышенной экспрессии IL-11 на патологию ГМК в печени. У мышей SMRS наблюдается повышенная экспрессия белка IL-11 в печени (25A), неизменные отношения массы печени к массе тела (25B) и повышенная экспрессия коллагена в печени (25C) по сравнению с контрольными животными SMWT. \* обозначает  $P < 0,05$ .

30 **Фигура 26.** График, демонстрирующий, что мыши SMRS обладают повышенной экспрессией внеклеточного матрикса и воспалительных генов в печени. Левые столбцы представляют собой контрольных животных SMWT, правые столбцы представляют собой мышей SMRS со сверхэкспрессией IL-11 в ГМК. \*, \*\*\* обозначают  $P < 0,05$  и  $P < 0,001$ , соответственно.

35 **Фигура 27A-27C.** Влияние повышенной экспрессии IL-11 на патологию ГМК в почке. У мышей SMRS наблюдается повышенная экспрессия белка IL-11 в почке (27A), повышенное отношение массы почки к массе тела (27B), и наблюдается тенденция к повышенной экспрессии коллагена в почках (27C) по сравнению с контрольными животными. \* обозначает  $P < 0,05$ .

40 **Фигура 28.** График, демонстрирующий, что мыши SMRS обладают повышенной экспрессией внеклеточного матрикса и воспалительных генов в почке. Левые столбцы представляют собой контрольных животных SMWT, правые столбцы представляют собой мышей SMRS со сверхэкспрессией IL-11 в ГМК. \*, \*\*, \*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ , соответственно.

**Фигуры 29А-29С.** Влияние повышенной экспрессии IL-11 на патологию ГМК при воспалительных заболеваниях кишечника. У мышей SMRS при индукции IL-11 тамоксифеном (Tam) наблюдаются красные и опухшие прямые кишки (стрелочки) по сравнению с введением контрольного носителя кукурузного масла (Veh) или контрольными мышами SMWT, подвергшимися одному из  
5 воздействий (**29А**). У мышей SMRS после индукции Tam стул является более мягким и бледным по сравнению с контрольными животными SMWT (**29В**). Уровни кальпротектина (S100A8/A9) повышены в образцах стула мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT (**29С**).

**Фигуры 30А-30С.** Влияние повышенной экспрессии IL-11 на патологию ГМК в желудочно-кишечном тракте. Желудочно-кишечный тракт мышей SMRS демонстрирует покраснение и опухание по сравнению с контрольными животными SMWT (**30А**). Мыши SMRS демонстрируют повышенную экспрессию IL-11 в толстой кишке по сравнению с контрольными животными SMWT (**30В**). Иллюстративные срезы толстой кишки и тонкой кишки от мышей SMRS, окрашенные методом трихром по Массону, демонстрируют большую толщину стенок и фиброз кишечника по  
15 сравнению с контрольными животными SMWT (**30С**).

**Фигура 31.** График, демонстрирующий, что мыши SMRS обладают повышенной экспрессией внеклеточного матрикса и воспалительных генов в толстой кишке. Левые столбцы представляют собой контрольных животных SMWT, правые столбцы представляют собой мышей SMRS со  
20 сверхэкспрессией IL-11 в ГМК. \*, \*\*, \*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ , соответственно.

**Фигуры 32А-32D.** IL-11 активирован в тканях сердца, легких и аорты мышей с синдромом Марфана (MFS; **32А**). На **32В-32D** изображена денситометрическая оценка экспрессии IL-11 по сравнению с экспрессией GAPDH (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы) в сердце, легких и  
25 аорте мышей с MFS, соответственно.

**Фигуры 33А-33D.** Вызванное сужением грудного отдела аорты (ТАС) ремоделирование аорты уменьшается путем ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов с использованием антител к IL11RA. На фигурах **33А** и **33В** показан внутренний размер корня аорты в конце систолы  
30 и конце диастолы для контрольных животных с имитацией без ТАС и у мышей после ТАС после введения антител к IL11, IL11R или контрольных IgG. На фигурах **33С** и **33D** показана максимальная скорость в дуге аорты и градиент давления, соответственно. \*, \*\*, \*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ , соответственно.

**Фигура 34.** Иллюстративные срезы проксимального отдела грудной аорты окрашивали методом трихром по Массону ( $n = 5$  на группу), демонстрируя, что вызванное ТАС ремоделирование аорты  
35 облегчается с помощью нейтрализующих антител к IL-11 и IL-11R, см. стрелочки. Масштабная полоска соответствует 100 мкм.

**Фигуры 35А и 35В.** Иллюстративные изображения (**35А**) и кумулятивные графики (**35В**) демонстрируют миграцию СГМК от мышей, получавших рекомбинантный мышинный IL-11 (5 нг/мл)

и рекомбинантный мышинный TGFβ1 (5 нг/мл) с антителом к IL11 и без него (2 мкг/мл) или эквивалентной концентрацией контрольного изотипического IgG в течение 0 ч (верхние секции) или 24 ч (нижние секции). Масштабная полоска соответствует 200 мкм. \*, \*\* обозначает P < 0,05, P < 0,01, соответственно.

5

**Фигуры 36А и 36В.** Иллюстративные изображения (36А) и кумулятивные графики (36В) демонстрируют мышей дикого типа (WT) и мышей с удаленным IL11ra1 (KO), не получавших стимуляторов, получавших ангиотензин II (ANGII, 100 мкМ), рекомбинантный мышинный TGFβ1 (5 нг/мл) и рекомбинантный мышинный IL-11 (5 нг/мл) в течение 0 часов (верхние секции) и 48 часов (нижние секции). Масштабная полоска соответствует 200 мкм. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* обозначают P < 0,05, P < 0,01, P < 0,001 и P < 0,0001, соответственно.

10

### Примеры

В следующих примерах авторы изобретения демонстрируют, что экспрессия гена и белка IL-11 в ГМК повышается в ответ на обработку TGFβ1, что стимуляция ГМК посредством IL-11 вызывает продукцию IL-11 в аутокринной петле, что стимуляция ГМК посредством TGFβ1 либо IL-11 снижает экспрессию нормального сократительного фенотипа ГМК и повышает экспрессию маркеров патологического секреторного фенотипа ГМК, и что ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов нейтрализующим антителом к IL-11 устраняет стимулирующее действие TGFβ1 на фенотип/активность ГМК.

20

Фенотип ГМК может переключаться между физиологическим сократительным/расслабляющим фенотипом и патологическим пролиферативным/гиперплазированным/матрикс-синтезирующим состоянием<sup>3</sup>. Последний патологический фенотип вовлечен в развитие нескольких заболеваний, которые часто связаны с повышенной передачей сигналов TGFβ1, а также с активацией других сигнальных путей.

25

TGFβ1 и его рецепторы были предложены в качестве терапевтических мишеней для заболеваний, связанных с ГМК, но их ингибирование связано с серьезными побочными действиями<sup>59,60</sup>. Авторы изобретения стремились идентифицировать факторы, расположенные ниже TGFβ1, которые необходимы для эффектов передачи сигналов TGFβ1 в ГМК, подходящие в качестве мишеней. Для идентификации надежной отличительной черты эффектов действия TGFβ1 в ГМК была использована систематическая интегрированная платформа с использованием первичных человеческих сосудистых ГМК (СГМК), полученных от нескольких индивидуумов.

30

35

### Пример 1. Когорта пациентов и получение СГМК

В исследование были включены пациенты в возрасте ≥21 и ≤81 лет, перенесшие аортокоронарное шунтирование (АКШ) в Национальном кардиологическом центре Сингапура. Пациенты с пороком сердца или предшествующим вмешательством в области предсердий были исключены. Ткани аортальной пуговицы (АВ) и левой внутренней грудной артерии (LIMA) собирали и использовали

40

образцы для выращивания первичных сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) методом культивирования эксплантатного материала. Биоптаты аортальной пуговицы и/или левой внутренней грудной артерии были взяты у 15 пациентов (АВ: n = 6; LIMA: n = 11), перенесших АКШ. Затем из этих образцов получали СГМК следующим образом.

5

Биоптаты АВ и LIMA были взяты у пациентов с АКШ во время операции со вскрытием грудной клетки. Слой адвентициальной оболочки удаляли, а эндотелий осторожно соскребали пинцетом, слой средней оболочки измельчали на кусочки по 1-2 мм<sup>3</sup> и помещали в чашки размером 6 см. Расстояние между соседними тканями составляло приблизительно 5 мм. Человеческие СГМК культивировали *in vitro* в среде M231 (M-231-500, Life Technologies) с добавкой для роста гладких мышц (SMGS; S-007-25, Life Technologies) и 1% антибиотиком-антимикотиком (15240062, Life Technologies), в увлажненной атмосфере при 37 °С и 95% воздуха/5% CO<sub>2</sub>. Среду для культивирования клеток заменяли свежей средой каждые 2-3 дня для удаления клеточного детрита и поддержания физиологического pH. При конфлюэнтности 80-90% клетки пассировали

10

15

20

25

путем отделения с помощью аккутазы (A6964, Sigma-Aldrich) с использованием стандартных методов диссоциации клеток. При 1-2 пассаже фибробласты и эндотелиальные клетки выделяли из клеточных культур магнитным разделением с помощью колонок LD (130-042-901, Miltenyi Biotec) с использованием микрогранул, меченных CD90 (Thy-1, 130-096-253, Miltenyi Biotec) для выделения фибробластов и CD144 (VE-Cadherin, 130-097-857, Miltenyi Biotec) для выделения эндотелиальных клеток. Прошедшие отрицательный отбор СГМК, оставшиеся в культуре, использовали при дальнейшем пассировании. Все эксперименты проводили при низких пассажах клеток ( $\leq P4$ ), и клетки синхронизировали в бессывороточной базальной среде M231 с 0,2% фетальной бычьей сыворотки (10500064, Life Technologies) в течение 16 часов до обработки в бессывороточной среде M231.

25

Для характеристики перехода СГМК, вызванного стимуляцией TGF $\beta$ 1, проводили молекулярное и клеточное фенотипирование, и результаты были объединены с большими базами данных экспрессии генов в человеческих тканях (GTEx61) и типах клеток (FANTOM62).

### 30 Пример 2. Анализ секвенирования РНК

Анализ секвенирования РНК проводили на разных типах клеток следующим образом.

35

40

Тотальную РНК выделяли с использованием набора Trizol Plus RNA mini kit (12183555, Life Technologies). РНК количественно оценивали с использованием набора для анализа высокой чувствительности РНК Qubit (Life Technologies) и оценивали на предмет деградации на основе числа целостности РНК (RIN) с использованием набора реагентов для анализа LabChip GX RNA (Perkin Elmer). Набор TruSeq Stranded mRNA Library Prep kit (Illumina) использовали для оценки содержания транскриптов, следуя стандартным инструкциям производителя. Вкратце, поли(A)+ РНК очищали из 0,8-1 мкг тотальной РНК с RIN > 7, фрагментировали и использовали для синтеза кДНК с последующим 3'-аденилированием, лигированием адаптера и ПЦР-амплификацией. Конечные библиотеки количественно определяли с использованием наборов для количественного

определения библиотек KAPA (KAPA Biosystems) в системе ПЦР в реальном времени StepOnePlus (Applied Biosystems) в соответствии с руководством производителя. Качество и средний размер фрагментов конечных библиотек определяли с использованием набора реагентов LabChip GX DNA High Sensitivity Reagent Kit (Perkin Elmer). Библиотеки объединяли и секвенировали на настольном секвенаторе NextSeq 500 с использованием метода секвенирования спаренных концов на 75 п.н.

Необработанные данные секвенирования (файлы .bcl) были демультимплексированы в отдельные файлы чтений FastQ с помощью bcl2fastq v2.16.0.10 от Illumina на основе уникальных пар индексов. Последовательности адаптеров и низкокачественные чтения/основания были обрезаны с использованием Trimmomatic v0.36<sup>6</sup>, и качество чтений оценивали с помощью FastQC v0.11.5. Высококачественные чтения были картированы на человеческий референсный геном GRCh38 v86 от Ensembl или мышинный референсный геном GRCm38 v86 с использованием Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) v2.5.2b<sup>7</sup>. Параметры выравнивания STAR были выбраны на основе параметров, используемых в проекте ENCODE. Необработанное число уникально картированных чтений (спаренных концов) для конкретных цепей были суммированы с помощью featureCounts<sup>8</sup> для получения количественной оценки характеристик генома на уровне генов: featureCounts -t exon -g gene\_id -s 2 -p. Дифференциальный профиль экспрессии (DE) получали с помощью DESeq2 v1.14.1 с использованием необработанного числа чтений из featureCounts.

Авторы провели минимальную предварительную фильтрацию для удаления генов, не имевших чтений или имевших только 1 чтение во всех образцах, чтобы уменьшить объем данных и ускорить процесс анализа. Идентификаторы образцов были включены в качестве независимых переменных в формулу проектирования DESeq2, чтобы исключить групповой эффект из-за образцов и повысить чувствительность для выявления различий между условиями. Базовое условие всегда использовали в качестве референсного уровня для парного сравнения. Был создан MA-график с усадкой, чтобы показать log<sub>2</sub>-кратные изменения по сравнению со средним значением нормированного числа чтений, и точки окрашивали в красный цвет, если скорректированное р-значение было меньше 0,1.

Первичные человеческие СГМК были секвенированы на глубину ~ 20 М чтений на образец. Подавляющее большинство чтений были картированы на уникальное положение генома. Уникально выровненные чтения подсчитывали для оценки уровня экспрессии всех аннотированных генов (фигура 1).

### 35 Пример 3. Проверка чистоты культуры СГМК

Для обеспечения чистоты культуры СГМК был проведен анализ основных компонентов (PCA), в котором данные секвенирования РНК, полученные для культур СГМК (не стимулированных TGFβ1), сравнивали с данными секвенирования РНК, полученными из первичных сердечных фибробластов (FIB) и эндотелиальных клеток пупочной вены человека (EC).

Первичные человеческие фибробласты были получены методом эксплантации из биоптатов предсердий, полученных из правого предсердия пациентов (n = 84), перенесших процедуру АКШ. Человеческие сердечные фибробласты (FIB) готовили следующим образом: биоптаты правого предсердия взвешивали, измельчали на кусочки по 1-2 мм<sup>3</sup> и помещали в чашки по 6 см.

5 Человеческие FIB выращивали и поддерживали в среде DMEM (Life Technologies) с добавкой 20% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Hyclone) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco) в увлажненной атмосфере при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Среду обновляли каждые 2-3 дня. При конфлюэнтности 80-90% клетки пассировали с использованием стандартных методов трипсинизации. Все эксперименты проводили при низком пассаже клеток (<P4), и клетки  
10 культивировали в бессывороточной среде DMEM в течение 16 часов до обработки.

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (EC) были получены от Lonza (CC-2519). EC выращивали и выдерживали в 10 см чашках со средой EGM-2 Bullet Kit (Lonza, CC-3162) в увлажненной атмосфере при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Среду обновляли каждые 2-3 дня. При  
15 конфлюэнтности 80-90% клетки пассировали с использованием стандартных методов трипсинизации. Все эксперименты проводили при низком пассаже клеток (<P4), и клетки культивировали в базовой среде EBM-2 в течение 16 часов до обработки.

Результаты анализа основных компонентов показаны на фигуре 2. Было обнаружено, что типы  
20 клеток объединяются в различающиеся группы, что демонстрировало гарантии того, что культуры СГМК из АВ и LIMA не являются EC или FIB. Анализ также показал, что СГМК, полученные из АВ или LIMA, отличаются друг от друга.

Анализ уровней экспрессии РНК маркерных генов для EC, FIB и СГМК также подтвердил  
25 результаты PCA: CD31, маркерный ген эндотелиальных клеток, был высоко экспрессирован в культуре EC, но не в культурах СГМК или FIB. Это также подтвердило, что EC не присутствовали в культурах СГМК. СГМК также экспрессируют более низкие уровни THY-1 - маркера фибробластов, и более высокие уровни маркеров гладких мышц сосудов ELN и FBLN по сравнению с другими типами клеток (фигуры 3A-3D).

30 Фигура 4, кроме того, демонстрирует морфологические различия между EC, фибробластами и СГМК согласно результатам микроскопического исследования. В совокупности фигуры 2, 3 и 4 демонстрируют, что следующие исследования были проведены с использованием чистых культур первичных человеческих СГМК.

35 Пример 4. Анализ изменений экспрессии РНК, связанных с передачей сигналов TGFβ1, с помощью секвенирования РНК

Анализ секвенирования РНК проводили на исходных и стимулированных TGFβ1 СГМК из АВ и LIMA на ранних пассажах 3-4 для оценки полногеномных изменений экспрессии РНК в ответ на  
40 передачу сигналов TGFβ1. СГМК стимулировали TGFβ1 (5 нг/мл; 24 часа) и проводили анализ секвенирования РНК, как описано в примере 2 (фигура 5).

Уровни транскриптов РНК затем сравнивали между стимулированными TGFβ1 и нестимулированными СГМК для выявления генов, экспрессия которых повышалась при стимуляции TGFβ1. Для каждого локуса гена подсчитывали уникально выровненные чтения и определяли дифференциальную экспрессию с использованием пакета DEseq2<sup>63</sup>.

Результаты анализа показаны на фигуре 6. Было обнаружено, что IL-11 значительно активируется в СГМК, полученных из АВ и LIMA, в ответ на стимуляцию TGFβ1 (FC 4,39 и FC 3,16, соответственно; скорректированные Р-значения =  $1,69 \times 10^{-11}$  и  $4,55 \times 10^{-07}$ , соответственно). Эта очень значительная активация IL-11 в СГМК, происходящих как из АВ, так и из LIMA, подтвердила, что TGFβ1 активирует IL-11 на уровне РНК в разных типах СГМК и у нескольких индивидуумов.

Затем авторы подтвердили, что эта надежная отличительная черта активации IL-11 также имела место на белковом уровне путем проведения анализа ELISA на супернатанте клеточной культуры, полученном из нестимулированных СГМК и СГМК, стимулированных TGFβ1 (5 нг/мл, 24 ч), в 3 параллельных анализах. 39-кратное увеличение IL-11 было обнаружено в супернатанте клеточной культуры СГМК, стимулированных TGFβ1 (фигура 7). Тот факт, что увеличение секретируемого IL-11, вызванное стимуляцией TGFβ1, было больше, чем увеличение уровней РНК IL-11 (можно сравнить фигуры 6С и 6D с фигурой 7), свидетельствует о том, что TGFβ1 может влиять на уровни IL-11 посредством посттранскрипционной регуляции.

#### Пример 5. Анализ мишеней для IL-11

Чтобы исследовать, влияет ли IL-11, секретируемый СГМК в ответ на стимуляцию посредством TGFβ1, на СГМК, или только передает сигналы другим типам клеток, находящихся в непосредственной близости, экспрессию рецептора IL-11α (IL-11RA) анализировали более чем в 500 линиях клеток из каталога PHANTOM<sup>62</sup>.

Уровни экспрессии всех генов в первичных типах клеток с параллельными анализами были загружены с веб-ресурса FANTOM5<sup>62</sup> (119 типов клеток). Поскольку данные FANTOM5 находятся на уровне экспрессии сайта инициации транскрипции (TSS), полученной из секвенирования генов CAGE (кэп-анализ экспрессии генов), экспрессию генов рассчитывали путем суммирования числа всех чтений, которые были отнесены к отдельно взятому гену. Затем их нормировали по размеру библиотеки, чтобы рассчитать TPM (транскрипты на миллион) для каждого гена. Чтобы сравнить профили экспрессии *IL-11RA* и *IL-6R*, TPM для этих двух генов были получены на различных образцах первичных клеток, которые охватывали типы клеток всех линий. В каждом случае, когда экспрессия *IL-11RA* или *IL-6R* была выше уровня шума, эти типы клеток были выделены и классифицированы, как описано в онтологии типов клеток FANTOM5.

Результаты показаны на фигуре 8. Было обнаружено, что клетки имеют тенденцию экспрессировать либо рецептор IL-11, либо рецептор IL-6, но редко оба вместе. Экспрессия рецептора IL-6 осуществлялась в основном на иммунных клетках, тогда как экспрессия рецептора



IL-11 была обнаружена в линии мезенхимных клеток и гладкомышечных клетках (выделено на фигуре 8).

#### Пример 6. Продукция IL-11 СГМК в ответ на стимуляцию посредством IL-11

- 5 Несколько линий гладкомышечных клеток экспрессируют рецептор IL-11, что дает основания полагать, что IL-11 не только секретируется, но также оказывает непосредственное влияние на СГМК. Это дает основания предполагать наличие аутокринной петли IL-11, если IL-11 индуцирует свою собственную экспрессию на СГМК. Чтобы проверить эту гипотезу, был получен слитый белок IL-11:IL-11RA, называемый hyper IL-11<sup>64</sup>, методами рекомбинантной ДНК и экспрессии белков.
- 10 Hyper IL-11 конструировали с использованием фрагмента IL-11RA (аминокислотные остатки с 1 по 317, состоящие из домена с 1 по 3; UniProtKB: Q14626) и IL-11 (аминокислотные остатки с 22 по 199 из UniProtKB: P20809) с линкером из 20 аминокислот (SEQ ID NO: 5). Аминокислотная последовательность Hyper IL-11 представлена в SEQ ID NO: 4.
- 15 Hyper IL-11 является мощным стимулятором передачи сигналов IL-11, схожим с гибридным белком IL-6:IL-6R, описанным в Lokau et al., Cell Reports (2016) 14, 1761–1773. Авторы изобретения подтвердили, что ELISA, используемый для обнаружения растворимого секретируемого IL-11, не распознает hyper IL-11 (фигура 9). Вкратце, уровни IL-11 в равных объемах сред для культивирования клеток добавляли в лунки планшета для ELISA и количественно определяли IL-
- 20 11 с использованием набора для определения человеческого IL-11 методом ELISA, Human IL-11 Quantikine ELISA kit (D1100, R&D Systems), в соответствии с протоколом производителя.

Затем авторы изобретения использовали тот же самый набор для ELISA для анализа секреции IL-11 в среду для культивирования СГМК, стимулированных hyper IL-11. Вкратце, СГМК

25 культивировали в присутствии 0,2, 0,5 и 1 нг/мл hyper IL-11 в течение 24 часов, после чего супернатант клеточной культуры анализировали на IL-11 с использованием набора для определения человеческого IL-11 методом ELISA, Human IL-11 Quantikine ELISA kit. Таким образом авторы смогли определить, приводит ли опосредованная IL-11 передача сигналов в СГМК (инициируемая hyper IL-11) к продукции IL-11 СГМК аутокринным путем.

30 Результаты показаны на фигуре 10. Было обнаружено, что Hyper IL-11 вызывает секрецию IL-11 СГМК дозозависимым образом.

#### Пример 7. Влияние стимуляции IL-11 на экспрессию генов СГМК

35 Далее авторы изобретения проанализировали действия стимуляции IL-11 на экспрессию РНК СГМК. Человеческие СГМК из АВ и LIMA культивировали в течение 24 ч в присутствии 5 нг/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-11 человека (IL-11; PHC0115, Life Technologies), и затем проводили анализ секвенирования РНК, как описано в примере 2.

40 Результаты показаны на фигуре 11. Было обнаружено, что IL-11 не вызывал сильного транскрипционного ответа в СГМК. Более того, стимуляция с помощью IL-11 не сильно повышала

экспрессию или РНК IL-11, что дает основания полагать, что повышенная экспрессия белка IL-11 в ответ на обработку IL-11 (фигура 10) достигается посредством посттранскрипционной регуляции.

#### Пример 8. Влияние обработки IL-11 на фенотип СГМК

5 Затем авторы изобретения дополнительно исследовали влияние IL-11 на фенотип и активность СГМК путем анализа маркеров различных фенотипов ГМК с использованием платформы Operetta.

СГМК высевали в 96-луночные черные планшеты CellCarrier (Perkin-Elmer) при плотности  $1 \times 10^4$  клеток/лунку и инкубировали в среде в течение 24 часов. Затем клетки культивировали без стимуляции или стимулировали путем культивирования в течение 24 часов с TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл), IL-11 (5 нг/мл). Затем клетки промывали в натрий-фосфатном буфере (PBS) и фиксировали в 4% параформальдегиде (28908, Life Technologies) в течение 15 минут. Клетки пермеабелизовали 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) в PBS в течение 10 минут и промывали в PBS и промывочном буфере (0,25% BSA и 0,1% Tween-20 в PBS). Неспецифические сайты блокировали с использованием промывочного буфера с добавлением 0,25% BSA (блокирующий раствор; 30 м). Клетки инкубировали в течение ночи при 4 °C с антителами: трансгелин (SM22 $\alpha$ , 1:200; AB14106, Abcam), коллаген I (Col1, 1:500; AB292, Abcam), миокардин (MYOCD, 1:200; AB203614, Abcam). Все первичные антитела были разведены в блокирующем растворе. После промывки промывочным буфером клетки инкубировали с козым антимышиным (AB150113, Abcam) или антикроличьим (AB150077, Abcam) AF488 в течение 1 часа при комнатной температуре (RT) в темноте. Вторичные антитела разводили 1:1000 в блокирующем растворе. Клетки контрастно окрашивали родамин-фаллоидином (1:1000, R415, Life Technologies) и DAPI (1 мкг/мл, D1306, Life Technologies) в блокирующем растворе (1 час). Планшеты сканировали и получали изображения с помощью высокопроизводительной системы визуализации Operetta 1438 (PerkinElmer) с использованием объектива с 10-кратным увеличением. Каждое условие анализировали по меньшей мере в двух лунках и минимум 7 областях на лунку. Количественное определение SM22 $\alpha$ -положительных клеток проводили с использованием программного обеспечения Harmony версии 3.5.2 (PerkinElmer). Измерение интенсивности флуоресценции коллагена I и MYOCD на единицу площади проводили с помощью Columbus 2.7.1 (PerkinElmer).

30 Отложение коллагена также анализировали с помощью колориметрического анализа. Общий секретлируемый коллаген в супернатанте клеточной культуры определяли с использованием набора для определения коллагена с помощью Sirius red (9062, Chondrex) в соответствии с инструкциями производителя.

35 Результаты экспериментов показаны на фигурах 12A-12E. Было обнаружено, что как TGF $\beta$ 1, так и IL-11 вызывают снижение экспрессии маркеров сократительного фенотипа СГМК (т. е. SM22 $\alpha$ , миокардина) и увеличивают экспрессию коллагена I - маркера секреторного фенотипа СГМК.

Результаты дают основания полагать, что IL-11 является стимулирующим фактором патогенного перехода СГМК от сократительного к секреторному фенотипу и не является защитным ответом на стимуляцию с помощью TGFβ1.

#### 5 Пример 9. Влияние обработки IL-11 на миграцию СГМК

Для анализа влияния стимуляции IL-11 на миграцию СГМК проводили *in vitro* анализ методом «царапин» и анализ в камере Бойдена.

10 *In vitro* анализы методом «царапин» на ранах и анализы в камере Бойдена проводили дважды на образец пациента. Анализы методом «царапин» на ранах проводили с помощью конфлюэнтных монослоев СГМК. После синхронизации клеток культуральной средой с низким содержанием сыворотки (M231, содержащей 0,2% FBS) в течение 24 часов создавали линейную царапину с помощью наконечника стерильной пипетки, и клетки обрабатывали IL-11 (5 нг/мл) либо TGFβ1 (5 нг/мл) в течение 24 часов. Площадь раны визуализировали через 0 и 24 часа, и миграцию  
15 рассчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ. Вкратце, миграцию СГМК рассчитывали по формуле «миграция =  $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$ », где  $A_0$  - это площадь раны в 0 часов, а  $A_1$  - это площадь, не занятая СГМК, через 24 часа. 6-10 случайных областей на обработку были проанализированы и усреднены.

20 Анализы в камере Бойдена проводили с использованием набора для анализа миграции клеток Cell Migration Assay kit (CBA-100, Cell Biolabs Inc) в соответствии с протоколом производителя. СГМК ( $5 \times 10^4$  клеток/лунка) высевали внутри вставок трансвелл, а нижняя лунка камеры Бойдена содержала среду для культивирования клеток или среду для культивирования клеток с добавкой либо TGFβ1 (5 нг/мл), либо IL-11 (5 нг/мл). Через 24 часа миграцию СГМК в направлении нижней  
25 лунки определяли колориметрически при оптической плотности 560 нм.

Результаты экспериментов показаны на фигурах 13 и 14. Обработка IL-11 или TGFβ1 значительно увеличивала степень закрытия раны (фигура 13А и 13В). Наблюдалась тенденция к увеличению миграции СГМК в компартменты, содержащие TGFβ1 или IL-11 (фигуры 14А и 14В;  $P = 0,15$ ).

30 Для ингибирования передачи сигналов IL-11 клетки обрабатывали нейтрализующим антителом к IL-11 (2 мкг/мл, MAB218, R&D Systems) или мышинным IgG типа 2а (2 мкг/мл, MAB003, R&D Systems) в течение 24 часов в присутствии TGFβ1.

#### 35 Пример 10. Анализ влияния нейтрализации IL-11 на действия, опосредованные TGFβ1, оказываемые на СГМК

Затем авторы изобретения исследовали, необходим ли IL-11 для опосредованного TGFβ1 влияния на фенотип и активность СГМК.

40 СГМК высевали в 96-луночные черные планшеты CellCarrier и инкубировали в среде в течение 24 часов, как описано в примере 8. Затем клетки культивировали без стимуляции или стимулировали

культуры в течение 24 часов с TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл), IL-11 (5 нг/мл) в присутствии EdU (10 мкМ/мл); и в присутствии или в отсутствие контрольного антитела IgG или нейтрализующего антитела к IL-11 (2 мкг/мл). Затем клетки промывали, фиксировали и окрашивали для анализа, как описано в примере 8. Включенный EdU метили с помощью AlexaFluor (AF) 488 с использованием набора для мечения Click-iT EdU (C10350, LifeTechnologies). Использовали 100 мкл реакционного коктейля Click-iT на лунку, коктейль состоял из 85 мкл реакционного буфера Click-iT, 4 мкл сульфата меди, 0,25 мкл азида AF488 и 10 мкл реакционной буферной добавки. Этот коктейль инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, клетки однократно промывали 100 мкл буфера для реакционной промывки Click-iT. Кроме того, промывали промывочным буфером (0,25% BSA и 0,1% Tween-20 в PBS). Планшеты сканировали и визуализировали, как описано в примере 8. Количественное определение EdU-положительных клеток проводили с использованием программного обеспечения Harmony версии 3.5.2 (PerkinElmer).

Результаты показаны на фигурах 15A-15C. Было обнаружено, что ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов с помощью нейтрализующего антитела к IL-11 ингибирует опосредованную TGF $\beta$ 1 стимуляцию пролиферации СГМК (фигура 15A) и продукцию коллагена I (фигура 15B и 15C).

*In vitro* анализы методом «царапин» на ранах проводили, как описано в примере 9, где клетки обрабатывали либо IL-11 (5 нг/мл), либо TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл) в присутствии нейтрализующего антитела к IL-11 (2 мкг/мл, MAB218, R&D Systems) или мышинового IgG типа 2a (2 мкг/мл, MAB003, R&D Systems) в течение 24 часов. Области раны визуализировали и анализировали, как описано в примере 9.

Результаты показаны на фигурах 16A и 16B. Было обнаружено, что ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов с помощью нейтрализующего антитела к IL-11 устраняет опосредованное TGF $\beta$ 1 увеличение закрытия раны с помощью СГМК.

Вызванная TGF $\beta$ 1 пролиферация клеток и продукция коллагена снижалась при использовании нейтрализующих антител к IL-11 (фигура 13). Это также наблюдалось для миграции СГМК при закрытии раны (фигура 14).

#### Пример 11. Статистический анализ

Статистический анализ высокопроизводительной визуализации и данных в отношении белков проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6. Интенсивность флуоресценции (коллаген I, MYOCD) нормировали относительно количества клеток, обнаруженных в поле, и регистрировали для 7 полей/лунку. Клетки, экспрессирующие EdU и SM22 $\alpha$ , определяли количественно с использованием ранее упомянутого программного обеспечения, и для каждого поля определяли процент EdU+ve или SM22 $\alpha$  +ve СГМК. Выбросы (ROUT 2%, Prism Software) были удалены перед анализом. При сравнении нескольких экспериментальных групп с одним состоянием (т. е. с нестимулированными клетками) авторы

корректировали P-значения по Даннету. При сравнении нескольких условий в рамках одного эксперимента авторы проводили коррекцию на многомерные данные в соответствии с Холм-Сидаком. Критерием статистической значимости было  $P < 0,05$ . Значения  $P < 0,05$ ,  $P 0,01$ ,  $P 0,001$  и  $P 0,0001$  обозначены \*, \*\*, \*\*\* и \*\*\*\*, соответственно.

5

#### Пример 12. Выводы

В совокупности данные дают основания полагать, что IL-11 действует ниже передачи сигналов TGF $\beta$ 1 в СГМК и управляет патологическим переходом от сократительного к секреторному фенотипу СГМК, и необходим для опосредованных TGF $\beta$ 1 действий в СГМК.

10

Таким образом, было установлено, что ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов может выступать в качестве варианта лечения заболеваний и состояний, предусматривающих переход СГМК от сократительного к секреторному фенотипу СГМК и/или действия передачи сигналов TGF $\beta$ 1 в СГМК.

15

#### Пример 13. IL-11 увеличивает массу гладкомышечных клеток кишечника и содержание коллагена

10-недельных самцов мышей с репортером Col1a1-GFP ежедневно подвергали подкожной инъекции либо 100 мкг/кг рекомбинантного мышинового IL-11 (mIL11), либо идентичного объема PBS в течение 20 дней (PBS: n = 3, IL-11: n = 4). При умерщвлении толстую кишку фиксировали в соответствии со стандартными протоколами изготовления срезов из замороженных клеток. Замороженные блоки разрезали на срезы толщиной 10 мкм. Серии срезов фиксировали и блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином с последующей инкубацией в течение ночи при 4 °C с первичными кроличьими антителами к  $\alpha$ SMA (разведение 1:200, Ab5694, Abcam). После промывки PBS срезы инкубировали с козьими анти-кроличьими антителами IgG H&L (Alexa Fluor® 647) (разведение 1:500, Ab150079, Abcam) и окрашивали ядра с помощью DAPI. После заливки в среду снимали изображения на микроскоп Olympus BX51 с использованием флуоресцентной микроскопии с помощью программного обеспечения ImagePro.

20

25

Результаты показаны на фигуре 17. Было обнаружено, что IL-11 вызывает расширение мышечного слоя слизистой оболочки, кругового слоя мышечной оболочки и продольных слоев мышечной оболочки, и вызывает увеличение секреции коллагена гладкомышечными клетками в этих слоях толстой кишки мыши.

30

Таким образом, было продемонстрировано, что опосредованная IL-11 передача сигналов увеличивает количество и активность секреторных ГМК в ряде различных тканей.

35

#### Пример 14. Сверхэкспрессия IL-11 способствует патологии ГМК в сердце/аорте

Влияние повышенной экспрессии IL-11 на фиброз сердца исследовали на мышах, которые условно экспрессируют IL-11 в гладкомышечных клетках при индукции тамоксифеном.

40

Самцы мышей с Cre, специфичной для гладкомышечных клеток (B6.FVB-Tg(Myh11-cre/ERT2)1Soff/J), были приобретены у Jackson Laboratory (01979; Бар Харбор, штат Мэн) и скрещены с самками мышей, несущими ген ROSA-IL11 (C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(CAG-Il11)</sup>Cook/J), доступными от Jackson Laboratory (031928), с получением мышей с условной экспрессией мышинового IL-11 исключительно в гладкомышечных клетках (SMRS). Процедура индукции тамоксифеном была начата в возрасте 6 недель и включала 3 дозы по 1 мг/кг в неделю, вводимые внутрибрюшинно, с последующим недельным периодом выведения. Однопометные животные только с Cre, специфичной для гладких мышц (SMWT), были выбраны в качестве контролей мышинового штамма, а в качестве контроля носителем для тамоксифена вводили кукурузное масло.

На фигуре 18A показана повышенная экспрессия белка IL-11 в сердцах 8-недельных мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT после двухнедельной индукции тамоксифеном (n = 6-7 на группу), детектированная с помощью иммуноблоттинга. На фигуре 18B показано, что отношения массы сердца к массе тела (HW/BW) у 8-недельных мышей SMRS были повышены по сравнению с контрольными животными SMWT (n = 8 на группу).

Срезы сердца от мышей SMRS и SMWT оценивали на коллаген путем окраски методом трихром по Массону. Повышенная экспрессия/секреция компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), таких как коллаген, свидетельствует о секреторном фенотипе ГМК. Сердечную ткань фиксировали в 10% формалине в нейтральном буфере в течение 24-48 часов, обезвоживали и помещали в формалин. Срезы (5 мкм) окрашивали методом трихром по Массону. Кроме того, определяли количество коллагена в тканях желудочков колориметрическим определением гидроксипролина с использованием набора для анализа Quickzyme Total Collagen (Quickzyme Biosciences).

На фигуре 18C показаны иллюстративные срезы сердца, окрашенные методом трихром по Массону (n = 3 на группу). Сердечная ткань от мышей SMRS демонстрирует периваскулярный фиброз по сравнению с контрольными животными SMWT. На фигуре 18D показано, что желудочки мышей SMRS демонстрируют повышенную экспрессию коллагена по сравнению с контрольными животными SMWT на основе оценки гидроксипролина (HPA; n = 5-6 на группу). Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \*\*, \*\*\*\* обозначает P < 0,01 и P < 0,0001, соответственно.

Таким образом, сверхэкспрессия IL-11 в гладкомышечных клетках способствует периваскулярному фиброзу в сердце.

*Экспрессия ВКМ и воспалительных генов*

Экспрессию генов ряда компонентов ВКМ и воспалительных генов в сердечной ткани количественно определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Образцы сердечной ткани были получены от мышей с опосредованной Cre сверхэкспрессией IL-11 ГМК, вызванной тамоксифеном.

40

Тотальную РНК экстрагировали из быстросзамороженных тканей с использованием реагента Trizol (Invitrogen) с последующей очисткой с помощью набора Purelink RNA mini kit (Invitrogen). кДНК получали с использованием набора для синтеза кДНК iScript, в котором каждая реакция содержала 1 мкг тотальной РНК, в соответствии с инструкциями производителя. Количественный анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени проводили на двух параллельных образцах с использованием технологии fast SYBR green (Qiagen) с помощью QuantStudio (Applied Biosystem). Данные экспрессии нормировали относительно уровней экспрессии мРНК GAPDH, и авторы использовали метод  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  для расчета кратности изменения. Специфические праймер-зонды были получены от Integrated DNA Technologies и приведены в таблице 1.

10

Гены	Прямой праймер (от 5' к 3')	Обратный праймер (от 5' к 3')
<i>IL-11</i>	AATTCCCAGCTGACGGAGATCACA	TCTACTCGAAGCCTTGTGTCAGCACA
<i>IL-11ra</i>	CAGCACGTCCTGAAGTCTCC	GGAAGTAAGGTAGCGGGTGG
<i>TGFβ1</i>	CCSTATATTTGGAGCCTGGA	CTTGCGACCCACGTAGTAGA
<i>Col1a1</i>	GGGGCAAGACAGTCATCGAA	GTCCGAATTCCTGGTCTGGG
<i>Col1a2</i>	CCCAGAGTGGAAACAGCGATT	ATGAGTTCTTCGCTGGGGTG
<i>Col3a1</i>	ATGCCACAGCCTTCTACAC	ACCAGTTGGACATGATTCACAG
<i>FN1</i>	CACCCGTGAAGAATGAAGA	GGCAGGAGATTTGTTAGGA
<i>MMP2</i>	ACAAGTGGTCCGCGTAAAGT	AAACAAGGCTTCATGGGGGC
<i>TIMP-1</i>	GGGCTAAATTCATGGGTTC	CTGGGACTTGTGGGCATATC
<i>IL6</i>	AGGATACCACTCCCAACAGACC	AGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>TNFα</i>	CTCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>CCL2</i>	GAAGGAATGGGTCCAGACAT	ACGGGTCAACTTCACATTCA
<i>CCL5</i>	GCTGCTTTCCTACCTCTCC	TCGAGTGACAAACACGACTGC

Результаты показаны на фигуре 17. Сверхэкспрессия IL-11 вызывает повышенную экспрессию компонентов ВКМ и воспалительных генов в ГМК сердца. Столбцы представляют собой среднюю экспрессию гена (нормированную относительно экспрессии GAPDH), где левые столбцы представляют собой контроль SMWT, а правые столбцы представляют собой группы со сверхэкспрессией SMRS (n = 5 на группу). Гены внеклеточного матрикса включали коллагены (*Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1*), фибронектин (*FN1*), матриксную металлопротеиназу (*MMP2*) и тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы (*TIMP-1*). Гены воспаления включали интерлейкин-6 (*IL-6*), фактор некроза опухоли-альфа (*TNFα*), С-С хемокиновый лиганд-2 и -5 (*CCL2* и *CCL5*, соответственно). Статистический анализ проводился с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \*, \*\*, \*\*\* обозначает P < 0,05, P < 0,01 и P < 0,001, соответственно.

#### Размер и функция сердца

Мышей с опосредованной Cre сверхэкспрессией IL-11, вызванной тамоксифеном, использовали для анализа влияния сверхэкспрессии IL-11 на размер и функцию сердца.

25

Экспрессию IL-11 вызывали, как и ранее. Трансторакальную эхокардиографию проводил на всех мышцах с использованием Vevo 2100 с линейным датчиком MS400 (VisualSonics), 18–38 МГц один обученный специалист по эхокардиографии, неосведомленный о генотипе и группе лечения.

5 Мышей анестезировали 2% изофлуораном и поддерживали на уровне 0,6-1,0% изофлурана, в то время как температуру тела поддерживали при 37 °С на нагреваемой платформе. Шерсть на груди и шее удаляли с помощью крема для депиляции и на грудную клетку наносили слой акустического контактного геля. Было получено в среднем 10 сердечных циклов в стандартном 2D и *m*-режиме по короткой оси на среднем уровне папиллярных мышц, и они были сохранены для офлайн-анализа размеров ЛЖ и толщины стенки в соответствии с ранее описанными методами (Gao S, et al. *Curr. Protoc Mouse Biol* 2011, 1, 71-83). Фракцию выброса ЛЖ рассчитывали с использованием модифицированного метода Хинона (Tortoledo FA, et al. *Circulation* 1983, 67, 579-584). Диаметр левого предсердия (ЛП) измеряли из парастернального доступа по длинной оси и усредняли по 3 измерениям. Массу ЛЖ оценивали согласно известным источникам (Fard CY, et al. *J Am Soc Echocardiogr* 2000;13: 582–7).

15 Результаты показаны на фигурах 19-21. На фигуре 19А показано, что мыши SMRS имеют меньшую массу тела по сравнению с контрольными животными SMWT, измеренную до эхокардиографии. Расчетная масса ЛЖ, основанная на эхокардиографии, демонстрирует более низкую массу сердца у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT, но повышенное отношение массы ЛЖ при поправке на массу тела (фигура 19В и 19С). На фигуре 19D представлен диаметр левого предсердия (ЛП), измеренный из парастернального доступа по длинной оси, и показан увеличенный размер ЛП у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT.

25 На фигурах 20А-20С показана толщина передней стенки, внутренний диаметр ЛЖ и толщина задней стенки ЛЖ, соответственно, в конце диастолы с поправкой на массу тела. Все три измерения были увеличены у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT.

30 На фигурах 21А-21С показана толщина передней стенки, внутренний диаметр ЛЖ и толщина задней стенки ЛЖ, соответственно, в конце систолы с поправкой на массу тела. Все три измерения были увеличены у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT.

На фигуре 21D показано, что фракция выброса была сохранена у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT.

35 На фигурах 19-21 каждая точка обозначает отдельную мышь. Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $p < 0,001$  и  $P < 0,0001$ , соответственно.

40 Таким образом, опосредованная *Cre* сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках приводит к гипертрофии левого желудочка (ЛЖ) и жесткости камеры с сохранением систолической функции, о чем свидетельствуют результаты эхокардиографии.



### Ремоделирование аорты

Мышей с опосредованной Cre экспрессией IL-11, вызванной тамоксифеном, использовали для анализа влияния сверхэкспрессии IL-11 на ГМК аорты.

5

8-недельных мышей SMRS, как и до этого, подвергали двухнедельной индукции тамоксифеном (n = 6-7 на группу).

10

Трансторакальную эхокардиографию проводил на всех мышах с использованием Vevo 2100 с линейным датчиком MS400 (VisualSonics), 18–38 МГц один обученный специалист по эхокардиографии, неосведомленный о генотипе и группе лечения. Мышей анестезировали 2% изофлуораном и поддерживали на уровне 0,6-1,0% изофлурана, в то время как температуру тела поддерживали при 37 °С на нагреваемой платформе. Шерсть на груди и шее удаляли с помощью крема для депиляции, и на грудную клетку наносили слой акустического контактного геля. Корень аорты и размеры восходящей аорты оценивали в В и *m*-режиме из парастернального доступа по

15

длинной оси с использованием подхода «от внутреннего края до внутреннего края» в соответствии с общепринятыми американскими и европейскими рекомендациями (Lang RM, et al. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 7, 79-108 (2006)). Максимальную скорость потока в аорте получали путем наложения импульсно-волнового доплера на аортальный клапан от дуги аорты из супрастернального доступа. Все измерения усредняли по трем сердечным циклам.

20

25

Результаты показаны на фигуре 22. Каждая точка обозначает отдельную мышь. Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \*\*, \*\*\*\* обозначают  $P < 0,05$  и  $P < 0,0001$ , соответственно.

30

На фигуре 22A показана повышенная экспрессия белка IL-11 в проксимальном отделе грудной аорты у 8-недельных мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT (детектированная с помощью иммуноблоттинга). На фигурах 22B и 22C показано, что внутренний диаметр корня аорты, измеренный в конце диастолы и конце систолы, соответственно, с поправкой на массу тела, больше у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT. На фигуре 22D показано, что внутренний диаметр восходящего отдела аорты в конце систолы с поправкой на массу тела больше у мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT. На фигуре 22E показано, что у мышей SMRS сохранена максимальная скорость потока в аорте по сравнению с контрольными животными.

35

Таким образом, опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках приводит к ремоделированию аорты с сохранением скорости потока.

Пример 15. Сверхэкспрессия IL-11 способствует патологии ГМК в легком

Влияние повышенной экспрессии IL-11 на фиброз легкого исследовали с использованием мышинной модели опосредованной Cre сверхэкспрессии IL-11 ГМК, вызванной тамоксифеном.

- 5 8-недельных мышей SMRS подвергали двухнедельной индукции тамоксифеном, как и до этого (n = 6-7 на группу). Экспрессию коллагена измеряли оценкой гидроксипролина, как описано в примере 14 (n = 6 на группу). Иллюстративные срезы легких окрашивали методом трихром по Массону, как описано в примере 14 (n = 3 на группу).
- 10 Результаты показаны на фигуре 23. На фигуре 23A показана повышенная экспрессия белка IL-11 в легких у 8-недельных мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT (детектированная с помощью иммуноблоттинга). На фигуре 23B показано, что мыши SMRS демонстрируют повышенные отношения массы легких к массе тела по сравнению с контрольными животными SMWT (n = 8 на группу). На фигуре 23C показано, что легкие мышей SMRS демонстрируют повышенную экспрессию коллагена при коррекции относительно массы легких к массе тела по сравнению с контрольными животными на основе оценки гидроксипролина. На фигуре 23D представлены иллюстративные срезы легких, окрашенные методом трихром по Массону, и они демонстрируют усиление фиброза легких и инфильтрацию клеточным инфильтратом в легких SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT.
- 20 Таким образом, опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках приводит к усилению фиброза легких.

*Экспрессия ВКМ и воспалительных генов*

- 25 ПЦР в реальном времени проводили, как описано в примере 14.

На фигуре 24 показано, что опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках вызывает повышенную экспрессию внеклеточного матрикса и воспалительных генов в легких. Столбцы представляют собой среднюю экспрессию гена (нормированную относительно экспрессии GAPDH), где левые столбцы представляют собой SMWT, а правые столбцы представляют собой группы SMRS (n = 5 на группу). Гены внеклеточного матрикса включали коллагены (Col1a1, Col1a2, Col3a1), фибронектин (FN1), матриксную металлопротеиназу (MMP2) и тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы (TIMP-1). Гены воспаления включали интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли-альфа (TNF $\alpha$ ), С-С хемокиновый лиганд-2 и -5 (CCL2 и CCL5, соответственно). Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \*\*, \*\*\* обозначают P < 0,01 и P < 0,001, соответственно.

Пример 16. Сверхэкспрессия IL-11 способствует патологии ГМК в печени

- 40 Влияние повышенной экспрессии IL-11 на фиброз печени исследовали с использованием мышинной модели опосредованной Cre сверхэкспрессии IL-11 ГМК, вызванной тамоксифеном.

Индукцию тамоксифеном и оценку гидроксипролина проводили, как описано в примере 14.

5 Результаты показаны на фигурах 25A-25C. На фигуре 25A продемонстрирована повышенная экспрессия белка IL-11 в печени 8-недельных мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT после двухнедельной индукции тамоксифеном (n = 6-7 на группу; детектированная с помощью иммуноблоттинга). На фигуре 25B показано, что мыши SMRS демонстрируют неизменные отношения массы печени к массе тела по сравнению с контрольными животными (n = 8 на группу). На фигуре 25C показано, что печени мышей SMRS демонстрировали повышенную экспрессию коллагена по сравнению с контрольными животными на основе оценки гидроксипролина (n = 5-6 на группу). Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \* обозначает  $P < 0,05$ .

15 Таким образом, опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках приводит к усилению фиброза печени.

#### *Экспрессия ВКМ и воспалительных генов*

ПЦР в реальном времени проводили, как описано в примере 14.

20 На фигуре 26 показано, что опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках вызывает повышенную экспрессию белка внеклеточного матрикса в печени. Столбцы представляют собой среднюю экспрессию гена (нормированную относительно экспрессии GAPDH), где левые столбцы представляют собой SMWT, а правые столбцы представляют собой группы SMRS (n = 5 на группу). Гены внеклеточного матрикса включали коллагены (Col1a1, Col1a2, Col3a1), фибронектин (FN1), матриксную металлопротеиназу (MMP2) и тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы (TIMP-1). Гены воспаления включали интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли-альфа (TNF $\alpha$ ), С-С хемокиновый лиганд-2 и -5 (CCL2 и CCL5, соответственно). Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \*, \*\*\* обозначают  $P < 0,05$  и  $P < 0,001$ , соответственно.

30 Пример 17. Сверхэкспрессия IL-11 способствует патологии ГМК в почке  
Влияние повышенной экспрессии IL-11 на фиброз почки исследовали с использованием мышинной модели опосредованной Cre сверхэкспрессии IL-11 ГМК, вызванной тамоксифеном.

35 Индукцию тамоксифеном и оценку гидроксипролина проводили, как описано в примере 14.

40 Результаты показаны на фигурах 27A-27C. На фигуре 27A продемонстрирована повышенная экспрессия белка IL-11 в почках 8-недельных мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT после двухнедельной индукции тамоксифеном (n = 6-7 на группу; детектированная с помощью иммуноблоттинга). На фигуре 27B показано, что мыши SMRS демонстрируют повышенные отношения массы почек к массе тела по сравнению с контрольными животными

животными SMWT (n = 8 на группу). На фигуре 27C показано, что почки мышей SMRS демонстрируют тенденцию к повышенной экспрессии коллагена по сравнению с контрольными животными на основе оценки гидроксипролина (P = 0,12, n = 5-6 на группу). Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \* обозначает P < 0,05.

5

Таким образом, опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках приводит к усилению фиброза почек.

#### *Экспрессия ВКМ и воспалительных генов*

10 ПЦР в реальном времени проводили, как описано в примере 14.

На фигуре 28 показано, что опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках демонстрирует повышенную экспрессию белка внеклеточного матрикса в почках. Столбцы представляют собой среднюю экспрессию гена (нормированную относительно экспрессии GAPDH), где левые столбцы представляют собой SMWT, а правые столбцы представляют собой группы SMRS (n = 5 на группу). Гены внеклеточного матрикса включали коллагены (Col1a1, Col1a2, Col3a1), фибронектин (FN1), матриксную металлопротеиназу (MMP2) и тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы (TIMP-1). Гены воспаления включали интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли-альфа (TNF $\alpha$ ), С-С хемокиновый лиганд-2 и -5 (CCL2 и CCL5, соответственно). Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \*, \*\*, \*\*\* обозначают P < 0,05, P < 0,01 и P < 0,001, соответственно.

15

20

#### Пример 18. Сверхэкспрессия IL-11 способствует патологии ГМК при воспалительных заболеваниях кишечника

25 Влияние повышенной экспрессии IL-11 на воспалительные заболевания кишечника исследовали с использованием мышинной модели опосредованной Cre сверхэкспрессии IL-11 ГМК, вызванной тамоксифеном.

Индукцию тамоксифеном проводили, как описано в примере 14. Уровни фекального кальпротектина (S100A8/A9) определяли количественно, используя набор для определения мышинного гетеродимера S100A8/S100A9 с помощью ELISA, Mouse S100A8/S100A9 Heterodimer DuoSet ELISA (DY8596-05), в соответствии с инструкциями производителя. Фекальный калпротектин выделяли с использованием фекального экстракционного буфера (0,1 М Трис, 0,15 М NaCl, 1,0 М мочевины, 10 мМCaCl<sub>2</sub>, 0,1 М моногидрата лимонной кислоты, 5 г/л BSA).

35

На фигуре 29A показаны прямые кишки мышей SMRS и контрольных мышей SMWT после введения носителя (кукурузного масла) либо тамоксифена (3 дозы по 1 мг/кг/сут). У мышей SMRS, получавших тамоксифен, присутствуют красные и опухшие прямые кишки (стрелочки) по сравнению с другими группами мышей, что указывает на воспалительное заболевание кишечника.

40

На фигуре 29B приведены иллюстративные изображения образцов стула от мышей SMRS и SMWT после введения тамоксифена. У мышей SMRS стул является более мягким и бледным по сравнению с контрольными животными SMWT.

- 5 На фигуре 29C показано, что уровни кальпротектина (S100A8/A9), отражающие активность воспалительных клеток в кишечнике, повышены в образцах стула мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT (n = 8 на группу).

10 Таким образом, опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках приводит к воспалительному фенотипу кишечника у мышей SMRS.

Пример 19. Сверхэкспрессия IL-11 способствует патологии ГМК в желудочно-кишечном тракте  
Влияние повышенной экспрессии IL-11 на желудочно-кишечный тракт исследовали с использованием мышиной модели опосредованной Cre сверхэкспрессии IL-11 ГМК, вызванной  
15 тамоксифеном.

Индукцию тамоксифеном и окрашивание методом трихром по Массону проводили, как описано в примере 14.

20 На фигуре 30A показано, что выделенный желудочно-кишечный тракт у мышей SMRS демонстрирует покраснение и опухание по сравнению с контрольными животными SMWT. На фигуре 30B продемонстрирована повышенная экспрессия IL-11 в толстой кишке 8-недельных мышей SMRS по сравнению с контрольными животными SMWT после двухнедельной индукции тамоксифеном (n = 6-7 на группу; детектированная с помощью иммуноблоттинга). На фигуре 30C  
25 показаны иллюстративные срезы тонкой кишки и толстой кишки мышей SMWT и SMRS, окрашенные методом трихром по Массону (n = 3 на группу). Стенки кишечника мышей SMRS демонстрируют большую толщину стенок и фиброз кишечника по сравнению с контрольными животными.

30 Таким образом, опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках приводит к воспалению желудочно-кишечного тракта и фиброзу кишечника.

*Экспрессия ВКМ и воспалительных генов*

35 ПЦР в реальном времени проводили, как описано в примере 14.

На фигуре 31 показано, что опосредованная Cre сверхэкспрессия IL-11, вызванная тамоксифеном, в гладкомышечных клетках вызывает повышенную экспрессию белка внеклеточного матрикса в толстой кишке. Столбцы представляют собой среднюю экспрессию гена (нормированную  
40 относительно экспрессии GAPDH), где левые столбцы представляют собой SMWT, а правые столбцы представляют собой группы SMRS (n = 5 на группу). Гены внеклеточного матрикса

включали коллагены (Col1a1, Col1a2, Col3a1), фибронектин (FN1), матриксную металлопротеиназу (MMP2) и тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы (TIMP-1). Гены воспаления включали интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли-альфа (TNF $\alpha$ ), С-С хемокиновый лиганд-2 и -5 (CCL2 и CCL5, соответственно). Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного Т-критерия. \*, \*\*, \*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ , соответственно.

#### Пример 20. Экспрессия IL-11 при синдроме Марфана

Синдром Марфана (MFS) является аутосомно-доминантным состоянием соединительной ткани с повышенной передачей сигналов TGF $\beta$ . Мышей с MFS использовали для исследования экспрессии IL-11.

Все мыши имели фоновый генотип C57BL/6, их разводили и содержали в одной и той же комнате и давали пищу и воду без ограничений. Мыши с MFS (B6.129-*Fbn1*<sup>tm1Hcd/J</sup>) были приобретены у Jackson Laboratory (012885; Бар Харбор, штат Мэн). В экспериментах использовали гетерозиготных мышей, у которых развиваются классические проявления заболеваний человека (включая аневризмы аорты и патологии легких).

Вестерн-блот анализ проводили на экстрактах суммарного белка из сердца, легких и грудной аорты мыши. Замороженные ткани гомогенизировали путем осторожного раскачивания в буфере для лизиса (буфер RIPA, содержащий ингибиторы протеазы и фосфатазы (Roche)) с последующим центрифугированием для осветления лизата. Равные количества белковых лизатов разделяли с помощью SDS-PAGE, переносили на мембрану из ПВДФ (поливинилиденфторида) и инкубировали в течение ночи с антителом к IL11 (MAB218, R&D systems) и антителом к GAPDH (2118, Cell Signaling). Белки визуализировали с использованием системы детектирования ECL (Pierce) с соответствующими вторичными антителами: анти-кроличьим HRP (7074, Cell Signaling) или антимышиным HRP (7076, Cell Signaling).

На фигуре 32 показано, что IL-11 активирован в сердце, легких и аорте мышей с синдромом Марфана (MFS). На фигуре 32А показано, что ткани сердца, легких и аорты мышей с MFS демонстрировали повышенную экспрессию IL-11 по сравнению с контрольными животными дикого типа (WT) по результатам вестерн-блоттинга. На фигурах 32В-32D изображена денситометрическая оценка экспрессии IL-11 по сравнению с экспрессией GAPDH в сердце, легких и аорте мышей с MFS, соответственно.

#### Пример 21. Влияние ингибирования IL-11 на ремоделирование аорты

Поперечное сужение устья аорты (ТАС) у мышей использовали для анализа влияния ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов на вызванное ТАС ремоделирование ГМК аорты.

Все мыши имели фоновый генотип C57BL/6, их разводили и содержали в одной и той же комнате и давали пищу и воду без ограничений. Животным выполняли торакотомию с сужением восходящего отдела аорты с сохранением жизни. Конечные исследования проводили через 2 недели после операции ТАС. Животные того же возраста, выступавшие в качестве контролей имитацией, подвергались такой же оперативной процедуре без ТАС. Трансторакальная двухмерная эхокардиография с доплеровским анализом была использована для подтверждения увеличения градиента давления ( $> 40$  мм рт. ст.), свидетельствующего об успешном ТАС. Мышей умерщвляли через 2 недели после ТАС для гистологических и молекулярных исследований. В качестве послеоперационного медикаментозного лечения внутрибрюшинно вводили антитело к IL11, антитело к IL11R $\alpha$  или контрольное IgG в дозе 20 мг/кг два раза в неделю в течение двух недель подряд.

Результаты показаны на фигуре 33A-33D, где продемонстрировано, что вызванное ТАС ремоделирование аорты снижается путем ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов с использованием антител к IL11R $\alpha$ , несмотря на сохранение перегрузки давлением у мышей.

На фигурах 33A и 33B показан внутренний размер корня аорты в конце систолы и конце диастолы. На фигурах 33C и 33D показана максимальная скорость в дуге аорты и градиент давления, соответственно. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего ANOVA с апостериорным анализом Сидака для множественных сравнений. \*, \*\*, \*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$ , соответственно.

Иллюстративные срезы проксимального отдела грудной аорты фиксировали в 10% формалине в нейтральном буфере в течение 24-48 часов, обезвоживали и погружали в формалин. Срезы (5 мкм) окрашивали методом трихром по Массону для оценки коллагена, как описано в примере 14.

На фигуре 34 показано, что вызванное ТАС ремоделирование аорты улучшается нейтрализующими антителами к IL-11 и IL-11R, см. стрелочки. Иллюстративные срезы проксимального отдела грудной аорты окрашивали методом трихром по Массону ( $n = 5$ /группа). Масштабная полоска соответствует 100 мкм.

#### Пример 22. Влияние ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов на миграцию СГМК в аорте

Мышиные СГМК были выделены и культивированы с использованием модифицированного протокола, адаптированного из известных источников (Metz, Richard P., et al. *Cardiovascular Development*. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. 169-176; Weber, Sven C., et al. *Pediatric research* 70.3 (2011): 236). Грудные аорты вырезали у мышей, получавших рекомбинантный мышиный IL-11 (5 нг/мл) и рекомбинантный мышиный TGF $\beta$ 1 (5 нг/мл) с антителом к IL11 и без него (2 мкг/мл), или эквивалентную концентрацию контрольного изотипического IgG. Ткань аорты измельчали, расщепляли в течение 45 минут в среде M231, содержащей 1% антибиотика-антимикотика и 0,25

мг/мл Liberase TM (Roche), с легким перемешиванием при 37 °С, а затем эксплантаты культивировали в полной M231 с добавкой SMGS и 1% антибиотика-антимикотика при 37 °С. Смешанные клетки выращивали из расщепленной ткани аорты и при 80-90% конфлюэнтности при пассаже 1 СГМК были обогащены с помощью отрицательного отбора магнитными гранулами к CD45 (лейкоциты; 130-052-301, Miltenyi Biotec), CD90.2 (фибробласты; 130-049-101, Miltenyi Biotec) и CD31 (эндотелиальные клетки; 130-097-418, Miltenyi Biotec) с использованием сепаратора MidiMACS в соответствии с инструкциями производителя. Мышиные СГМК аорты использовали для последующих экспериментов при низких пассажах от 3 до 5. Для оценки миграции СГМК проводили анализы методом «царапин» на ранах *in vitro* с конфлюэнтными монослоями мышиных СГМК в течение 24 часов.

Фигуры 35А и 35В демонстрируют, что ингибирование антителом опосредованной IL-11 передачи сигналов нейтрализует опосредованную TGFβ1 миграцию мышиных СГМК аорты. Иллюстративные изображения (35А) и кумулятивные графики (35В) демонстрируют миграцию СГМК от мышей, получавших рекомбинантный мышиный IL-11 (5 нг/мл) и рекомбинантный мышиный TGFβ1 (5 нг/мл) с антителом к IL11 и без него (2 мкг/мл) или эквивалентной концентрацией контрольного изотипического IgG в течение 24 ч. Площадь раны визуализировали в 0 часов (верхние секции) и 24 часа (нижние секции), и рассчитывали миграцию с использованием программного обеспечения ImageJ с инструментом MRI wound healing tool, как описано ниже. Масштабная полоска соответствует расстоянию 200 мкм. Все данные выражены как среднее ± СКО. Статистическая значимость была установлена с помощью двустороннего ANOVA с множественными сравнениями по Сидуку. \*, \*\* обозначает P < 0,05, P < 0,01, соответственно.

В другом исследовании влияние множества известных стимуляторов миграции СГМК оценивали в мышиных СГМК аорты с удаленным IL-11Rα.

Мышиные СГМК были выделены и культивированы с использованием модифицированного протокола, адаптированного из известных источников (Metz, Richard P., et al. *Cardiovascular Development*. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. 169-176; Weber, Sven C., et al. *Pediatric research* 70.3 (2011): 236). Вкратце, мышей в возрасте от 4 до 6 недель без функциональных аллелей для IL11ra1 (Il11ra1<sup>-/-</sup>, KO) и их однопометников дикого типа (Il11ra1<sup>+/+</sup>, WT) умерщвляли и вырезали грудную аорту для культур СГМК. Грудную аорту от мышей WO и KO измельчали, расщепляли в течение 45 минут в среде M231, содержащей 1% антибиотика-антимикотика и 0,25 мг/мл Liberase TM (Roche), с легким перемешиванием при 37 °С, а затем эксплантаты культивировали в полной M231 с добавкой SMGS и 1% антибиотика-антимикотика при 37 °С. Смешанные клетки выращивали из расщепленной ткани аорты и при 80-90% конфлюэнтности при пассаже 1 СГМК были обогащены с помощью отрицательного отбора магнитными гранулами к CD45 (лейкоциты; 130-052-301, Miltenyi Biotec), CD90.2 (фибробласты; 130-049-101, Miltenyi Biotec) и CD31 (эндотелиальные клетки; 130-097-418, Miltenyi Biotec) с использованием сепаратора MidiMACS в соответствии с инструкциями производителя. Мышиные СГМК аорты использовали для последующих экспериментов при низких пассажах от 3 до 5.



Для оценки миграции СГМК проводили анализы методом «царапин» на ранах *in vitro* с конфлюентными монослоями мышиных СГМК. После истощения по сыворотке в среде с низким содержанием сыворотки (M231, содержащей 0,2% FBS) в течение 24 часов создавали линейную царапину с помощью наконечника стерильной пипетки, и клетки обрабатывали: только M231 (нестимулированным), ангиотензином II (ANGII, 100 мкМ) (Sigma-Aldrich), мышиным IL-11 (5 нг/мл) (Genscript) либо мышиным TGFβ1 (5 нг/мл) (R&D systems) в течение 48 часов. Область раны анализировали с использованием ImageJ с помощью плагина «MRI wound healing tool» (доступен по адресу [http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound\\_Healing\\_Tool](http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool)). Площадь раны визуализировали в 0 и 48 часов, и миграцию рассчитывали по формуле «миграция =  $(A0 - A1)/A0 \times 100$ », где  $A0$  - это площадь раны в 0 часов, а  $A1$  - это площадь, не занятая СГМК, через 24 часа или 48 часов. 6-10 случайных областей на обработку были проанализированы и усреднены. Продолжительность обработки 48 часов была представлена для исследований мышинной стимуляции в СГМК от WT и KO.

Результаты показаны на фигурах 36А и 36В. Иллюстративные изображения (36А) и кумулятивные графики (36В) демонстрируют мышей дикого типа (WT) и мышей с удаленным IL11ra1 (KO), не получавших стимуляторов, получавших ангиотензин II (ANGII, 100 мкМ), рекомбинантный мышиный TGFβ1 (5 нг/мл) и рекомбинантный мышиный IL-11 (5 нг/мл) в течение 48 часов. Площадь раны визуализировали в 0 часов (верхние секции) и 48 часов (нижние секции), и рассчитывали миграцию с использованием программного обеспечения ImageJ с инструментом MRI wound healing tool. Масштабная полоска соответствует расстоянию 200 мкм. Все данные выражены как среднее ± СКО. Статистическая значимость была установлена с помощью двустороннего ANOVA с множественными сравнениями по Даннетту. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* обозначают  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  и  $P < 0,0001$ , соответственно.

Таким образом, удаление IL-11Rα в мышиных СГМК аорты защищает от множества известных стимуляторов миграции СГМК, включая IL-11.

### Цитируемые источники

1. Du, X. & Williams, D. A. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood* **89**, 3897–3908 (1997).
2. Hegner, B. *et al.* Intrinsic Deregulation of Vascular Smooth Muscle and Myofibroblast Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Systemic Sclerosis. *PLoS One* **11**, e0153101 (2016).
3. Guo, X. & Chen, S.-Y. Transforming growth factor- $\beta$  and smooth muscle differentiation. *World J. Biol. Chem.* **3**, 41–52 (2012).
4. Hautmann, M. B., Madsen, C. S. & Owens, G. K. A Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Control Element Drives TGF $\beta$ -induced Stimulation of Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin Gene Expression in Concert with Two CA $\rho$ G Elements. *J. Biol. Chem.* **272**, 10948–10956 (1997).
5. Ding, R., Darland, D. C., Parmacek, M. S. & D'Amore, P. A. Endothelial-mesenchymal interactions in vitro reveal molecular mechanisms of smooth muscle/pericyte differentiation. *Stem Cells Dev.* **13**, 509–520 (2004).
6. Taki, H. *et al.* Monokine stimulation of interleukin-11 production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Atherosclerosis* **144**, 375–380 (1999).
7. Zimmerman, M. A. *et al.* Interleukin-11 attenuates human vascular smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H175–80 (2002).
8. Postlethwaite, Postlethwaite, Pattanaik, D. & Brown, M. Vascular involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *J. Inflamm. Res.* **105** (2011).
9. Matucci-Cerinic, M., Kahaleh, B. & Wigley, F. M. Review: Evidence That Systemic Sclerosis Is a Vascular Disease. *Arthritis & Rheumatism* **65**, 1953–1962 (2013).
10. Tuder, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I. & Flores, S. Pathology of pulmonary hypertension. *Clin. Chest Med.* **28**, 23–42, vii (2007).
11. Boin, F. *et al.* Oxidative stress-dependent activation of collagen synthesis is induced in human pulmonary smooth muscle cells by sera from patients with scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 123 (2014).
12. Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* **122**, 4306–4313 (2012).
13. Gordon, K. J. & Blobel, G. C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signalling pathways in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 197–228 (2008).
14. Crosas-Molist, E. *et al.* Vascular smooth muscle cell phenotypic changes in patients with Marfan syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 960–972 (2015).
15. Matt, P. *et al.* Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Circulation* **120**, 526–532 (2009).
16. Holm, T. M. *et al.* Noncanonical TGF $\beta$  signalling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science* **332**, 358–361 (2011).
17. Lindsay, M. E. & Dietz, H. C. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature* **473**, 308–316 (2011).
18. Dietz, H. C. 2006 Curt Stern Award Address. Marfan syndrome: from molecules to medicines. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 662–667 (2007).

19. Goumans, M.-J., Liu, Z. & ten Dijke, P. TGF-beta signalling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* **19**, 116–127 (2009).
20. Starke, R. M. *et al.* Vascular smooth muscle cells in cerebral aneurysm pathogenesis. *Transl. Stroke Res.* **5**, 338–346 (2014).
- 5 21. Nakajima, N., Nagahiro, S., Sano, T., Satomi, J. & Satoh, K. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in human cerebral aneurysmal walls. *Acta Neuropathol.* **100**, 475–480 (2000).
22. Nikol, S. *et al.* Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *J. Clin. Invest.* **90**, 1582–1592 (1992).
23. Nabel, E. G. *et al.* Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10759–10763 (1993).
- 10 24. Wolf, Y. G., Rasmussen, L. M. & Ruoslahti, E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J. Clin. Invest.* **93**, 1172–1178 (1994).
25. Edlin, R. S. *et al.* Characterization of primary and restenotic atherosclerotic plaque from the superficial femoral artery: Potential role of Smad3 in regulation of SMC proliferation. *J. Vasc. Surg.* **49**, 1289–1295 (2009).
- 15 26. Tsai, S. *et al.* TGF-beta through Smad3 signalling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H540–9 (2009).
27. Mallawaarachchi, C. M., Weissberg, P. L. & Siow, R. C. M. Smad7 gene transfer attenuates adventitial cell migration and vascular remodeling after balloon injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1383–1387 (2005).
- 20 28. Louis, S. F. & Zahradka, P. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp. Clin. Cardiol.* **15**, e75–85 (2010).
29. Suwanabol, P. A., Kent, K. C. & Liu, B. TGF- $\beta$  and restenosis revisited: a Smad link. *J. Surg. Res.* **167**, 287–297 (2011).
- 25 30. McCaffrey, T. A. *et al.* Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 2182–2188 (1997).
31. Mallat, Z. *et al.* Inhibition of transforming growth factor-beta signalling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ. Res.* **89**, 930–934 (2001).
32. Robertson, A.-K. L. *et al.* Disruption of TGF- $\beta$  signalling in T cells accelerates atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **112**, 1342–1350 (2003).
- 30 33. Grainger, D. J., Mosedale, D. E., Metcalfe, J. C. & Böttinger, E. P. Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J. Cell Sci.* **113 ( Pt 13)**, 2355–2361 (2000).
34. Grainger, D. J., Witchell, C. M. & Metcalfe, J. C. Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat. Med.* **1**, 1067–1073 (1995).
- 35 35. O'Connor, S. C. & Gornik, H. L. Recent developments in the understanding and management of fibromuscular dysplasia. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e001259 (2014).
36. Begelman, S. M. & Olin, J. W. Fibromuscular dysplasia. *Curr. Opin. Rheumatol.* **12**, 41–47 (2000).
- 40 37. Ganesh, S. K. *et al.* Clinical and biochemical profiles suggest fibromuscular dysplasia is a systemic disease with altered TGF- $\beta$  expression and connective tissue features. *FASEB J.* **28**, 3313–3324

- (2014).
38. Weber, B. R. & Dieter, R. S. Renal artery stenosis: epidemiology and treatment. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* **7**, 169–181 (2014).
  39. El Mabrouk, M., Diep, Q. N., Benkirane, K., Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. SAM68: a downstream target of angiotensin II signalling in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, H1954–62 (2004).
  40. Zhang, L. *et al.* Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. *J. Biol. Chem.* **285**, 13666–13677 (2010).
  41. Warren, H. R. *et al.* Genome-wide association analysis identifies novel blood pressure loci and offers biological insights into cardiovascular risk. *Nat. Genet.* **49**, 403–415 (2017).
  42. Cove-Smith, A. & Hendry, B. M. The regulation of mesangial cell proliferation. *Nephron Exp. Nephrol.* **108**, e74–9 (2008).
  43. Diamond, J. R. & Karnovsky, M. J. Focal and segmental glomerulosclerosis: analogies to atherosclerosis. *Kidney Int.* **33**, 917–924 (1988).
  44. Herrera, G. A. Plasticity of mesangial cells: a basis for understanding pathological alterations. *Ultrastruct. Pathol.* **30**, 471–479 (2006).
  45. Loeffler, I. & Wolf, G. Transforming growth factor- $\beta$  and the progression of renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant* **29 Suppl 1**, i37–i45 (2014).
  46. Santibanez, J. F., Krstic, J., Quintanilla, M. & Bernabeu, C. TGF- $\beta$  Signalling and Its Role in Cancer Progression and Metastasis. in *eLS* 1–9 (2016).
  47. Freyer, A. M., Johnson, S. R. & Hall, I. P. Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 569–576 (2001).
  48. Chung, K. F. The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 347–54; discussion 371–2 (2005).
  49. Chen, G. & Khalil, N. TGF-beta1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respir. Res.* **7**, 2 (2006).
  50. Ojiaku, C. A., Yoo, E. J. & Panettieri, R. A., Jr. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Function in Airway Remodeling and Hyperresponsiveness. The Missing Link? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **56**, 432–442 (2017).
  51. McMillan, S. J., Xanthou, G. & Lloyd, C. M. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signalling pathway. *J. Immunol.* **174**, 5774–5780 (2005).
  52. Johnson, P. R. *et al.* Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 474–477 (2001).
  53. Doeing, D. C. & Solway, J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J. Appl. Physiol.* **114**, 834–843 (2013).
  54. Takizawa, H. *et al.* Increased Expression of Transforming Growth Factor-  $\beta$  1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1476–1483 (2001).
  55. Stanzel, R. D. P., Lourenssen, S., Nair, D. G. & Blennerhassett, M. G. Mitogenic factors promoting

- intestinal smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C805–17 (2010).
56. Graham, M. F., Bryson, G. R. & Diegelmann, R. F. Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* **99**, 447–453 (1990).
- 5 57. Zhang, H., Xiong, Z.-M. & Cao, K. Mechanisms controlling the smooth muscle cell death in progeria via down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E2261–70 (2014).
58. Aliper, A. M. *et al.* Signalling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging* **7**, 26–37 (2015).
- 10 59. Bierie, B. *et al.* Abrogation of TGF-beta signalling enhances chemokine production and correlates with prognosis in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* **119**, 1571–1582 (2009).
60. Shull, M. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693–699 (1992).
- 15 61. GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **45**, 580–585 (2013).
62. Andersson, R. *et al.* An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* **507**, 455–461 (2014).
63. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. (2014). doi:10.1101/002832
- 20 64. Dams-Kozłowska, H. *et al.* A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine. *BMC Biotechnol.* **12**, 8 (2012).
65. Sarah J. Holdsworth-Carson, Marina Zaitseva, Beverley J. Vollenhoven, Peter A.W. Rogers; Clonality of smooth muscle and fibroblast cell populations isolated from human fibroid and myometrial tissues, MHR: Basic science of reproductive medicine, Volume 20, Issue 3, 1 March 2014, Pages 250–259.
- 25 66. Nierth-Simpson EN, Martin MM, Chiang T-C, et al. Human Uterine Smooth Muscle and Leiomyoma Cells Differ in Their Rapid 17β-Estradiol Signaling: Implications for Proliferation. *Endocrinology*. 2009;150(5):2436-2445.
- 30 67. Leibsohn S, d'Ablaing G, Mishell DR Jr, Schlaerth JB. Leiomyosarcoma in a series of hysterectomies performed for presumed uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:968–74;discussion 974–6.
68. Hussain N, Quezado M, Huizing M, Geho D, White JG, Gahl W, Mannon P. Intestinal disease in Hermansky-Pudlak syndrome: occurrence of colitis and relation to genotype. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jan;4(1):73-80.
- 35 69. Wang, L. & Lyerla, T. *Histochem Cell Biol* (2010) 134: 205.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Агент, способный ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения в способе лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК).  
5
2. Применение агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения в производстве лекарственного средства для применения в способе лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК).  
10
3. Способ лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.  
15
4. Агент для применения в способе по п. 1, применение по п. 2 или способ по п. 3, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.  
20
5. Агент для применения, применение или способ по любому из пп. 1-4, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены сосудистые ГМК (СГМК).
- 25 6. Агент для применения, применение или способ по любому из пп. 1-5, где указанный агент представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11.
7. Агент для применения, применение или способ по п. 6, где указанный агент выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.  
30
8. Агент для применения, применение или способ по п. 6 или п. 7, где указанный агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
- 35 9. Агент для применения, применение или способ по п. 6 или п. 7, где указанный агент представляет собой рецептор-ловушку IL-11.
10. Агент для применения, применение или способ по любому из пп. 1-5, где указанный агент способен снижать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.  
40

11. Агент для применения, применение или способ по п. 10, где указанный агент представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
12. Агент для применения, применение или способ по любому из пп. 1-11, где указанное  
5 заболевание представляет собой заболевание сердечно-сосудистой системы, пищеварительной системы, выделительной системы, дыхательной системы, почечной системы или репродуктивной системы.
13. Агент для применения, применение или способ по любому из пп. 1-12, где указанное  
10 заболевание выбрано из группы, состоящей из: атеросклероза, гипертензии, сосудистой аневризмы, синдрома Марфана, аневризмы аорты, синдрома Фурлонга, синдрома Сфринтцена-Голдберга, синдрома Луиса-Дитца, семейного синдрома аневризмы грудного отдела аорты, синдрома извитости артерий, аневризмы сосудов головного мозга, стеноза и рестеноза сосудов, атеросклероза, фиброзно-мышечной дисплазии (ФМД), надклапанного стеноза, стеноза почечной  
15 артерии, легочной артериальной гипертензии (ЛАГ), плексиформных поражений, фиброзно-мышечной дисплазии, телеангиэктазии, ахалазии, дисфагии, диареи, запора, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), стриктуры кишечника, стеноза привратника, целиакии, синдрома раздраженного кишечника, дивертикулита, болезни Крона, язвенного колита, заболевания почечной системы, фокально-сегментарного гломерулосклероза (ФСГС), IgA-нефропатии,  
20 серповидного гломерулонефрита, волчаночного нефрита, диабетической нефропатии (ДН), болезни мочевого пузыря, болезни легких, астмы, муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), системного склероза, синдрома прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS), лейомиомы, лейомиосаркомы и синдрома Германски-Пудлака (СГП).
- 25
14. Агент для применения, применение или способ по любому из пп. 1-13, где указанный способ лечения или предупреждения включает введение указанного агента субъекту, у которого повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.
- 30
15. Агент для применения, применение или способ по любому из пп. 1-14, где указанный способ лечения или предупреждения включает введение указанного агента субъекту, у которого определено, что экспрессия IL-11 или рецептора IL-11 является повышенной.
- 35
16. Агент для применения, применение или способ по любому из пп. 1-15, где указанный способ лечения или предупреждения включает определение того, повышена ли экспрессия IL-11 или рецептора IL-11 у субъекта, и введение указанного агента субъекту, у которого повышена экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.
- 40
17. Применение агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК).

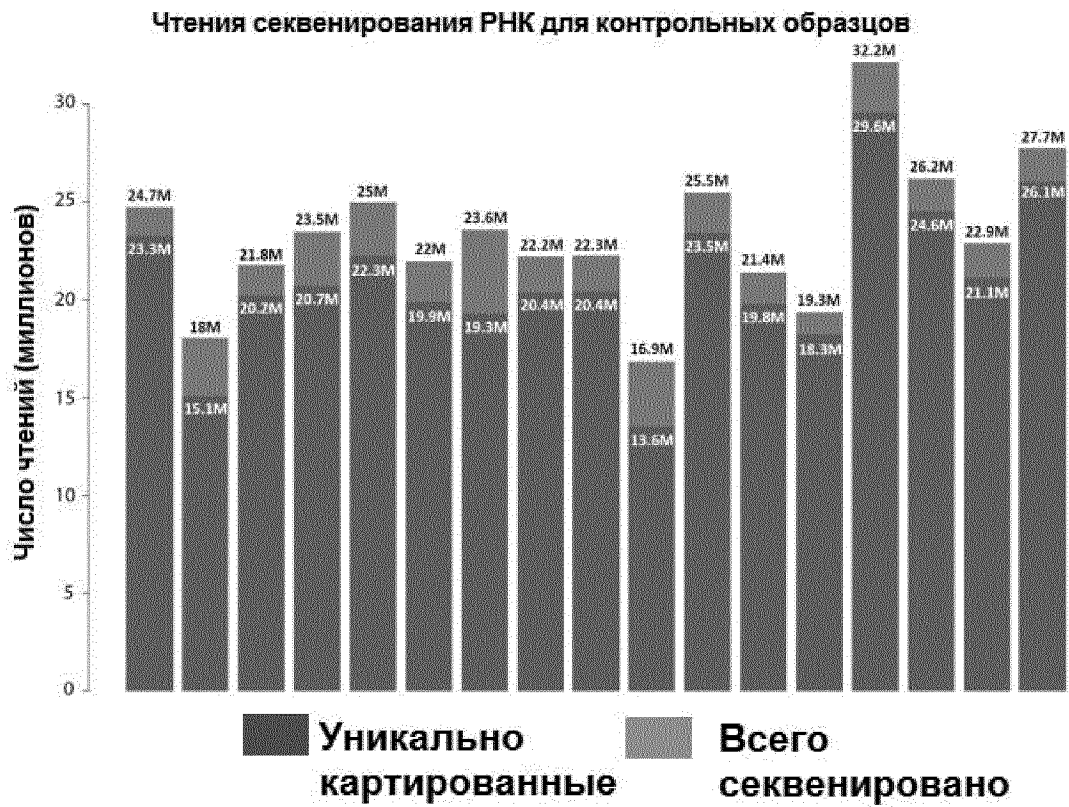
18. Способ ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК), включающий приведение ГМК в контакт с агентом, способным ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.
- 5 19. Способ ингибирования активности гладкомышечных клеток (ГМК) у субъекта, включающий введение указанному субъекту агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.
- 10 20. Применение или способ по любому из пп. 17-19, где ГМК представляют собой секреторные ГМК.
21. Применение или способ по любому из пп. 17-20, где ГМК представляют собой сосудистые ГМК (СГМК).
- 15 22. Применение или способ по любому из пп. 17-21, где указанный агент представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11.
- 20 23. Применение или способ по любому из пп. 17-22, где указанный агент выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
24. Применение или способ по любому из пп. 17-23, где указанный агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
- 25 25. Применение или способ по любому из пп. 17-23, где указанный агент представляет собой рецептор-ловушку IL-11.
26. Применение или способ по любому из пп. 17-21, где указанный агент способен снижать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.
- 30 27. Применение или способ по п. 26, где указанный агент представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
28. Способ определения пригодности субъекта для лечения или предупреждения  
35 заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), с помощью агента, способного ингибировать действие интерлейкина-11 (IL-11), при этом способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли у указанного субъекта экспрессия IL-11 или рецептора интерлейкина-11 (IL-11R).
- 40 29. Способ выбора субъекта для лечения или предупреждения заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), с помощью агента, способного



ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, при этом указанный способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли у указанного субъекта экспрессия IL-11 или рецептора IL-11.

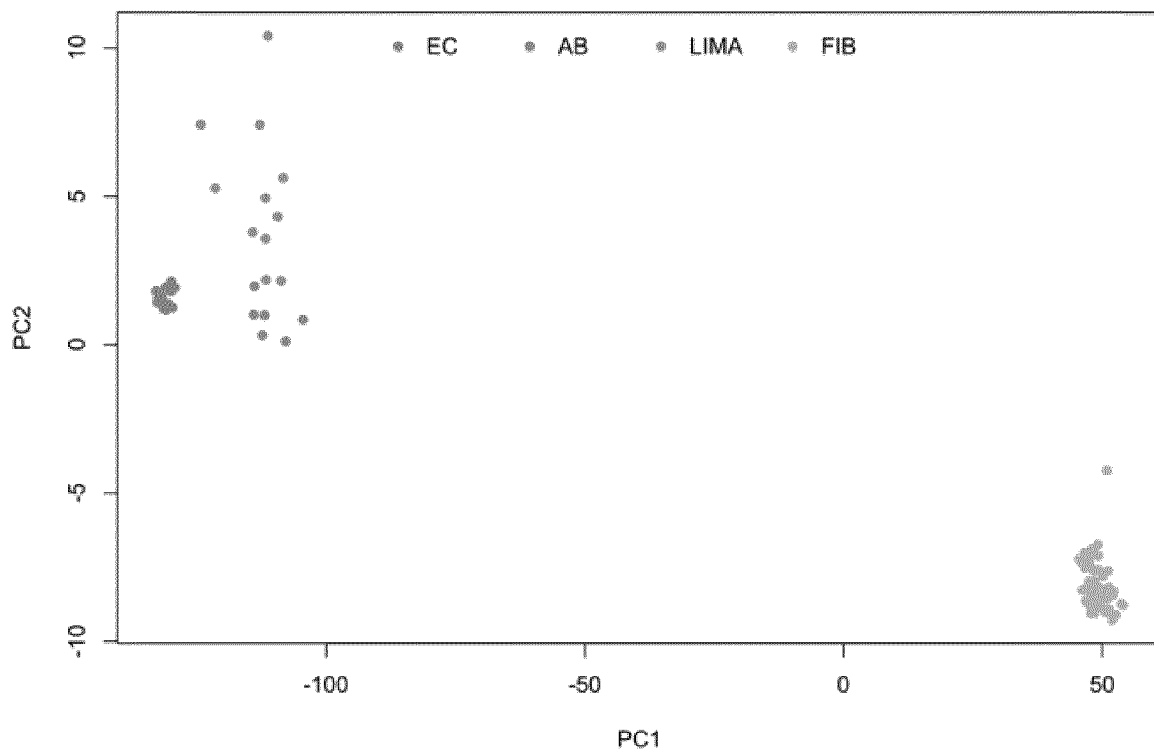
- 5 30. Способ диагностики заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или риска развития заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК, у субъекта, при этом указанный способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышения экспрессии интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 в образце, полученном от указанного субъекта.
- 10 31. Способ по п. 30, при этом указанный способ представляет собой способ подтверждения диагноза заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК, у субъекта с подозрением на наличие заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК.
- 15 32. Способ по п. 30 или п. 31, при этом указанный способ дополнительно включает выбор субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.
- 20 33. Способ по любому из пп. 28-32, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.
- 25 34. Способ по любому из пп. 28-33, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены сосудистые ГМК (СГМК).
- 30 35. Способ обеспечения прогноза для субъекта, имеющего заболевание, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или с подозрением на наличие указанного заболевания, при этом указанный способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 в образце, полученном от указанного субъекта, и, на основании указанного определения, обеспечение прогноза для
- 35 36. Способ по п. 35, при этом указанный способ дополнительно включает выбор субъекта, у которого определено, что экспрессия IL-11 или рецептора IL-11 повышена, для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.
- 40 37. Способ диагностики заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или риска развития заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК, у субъекта, при этом указанный способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более генетических факторов у указанного субъекта, позволяющих прогнозировать повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или повышение опосредованной IL-11 передачи сигналов.

38. Способ по п. 37, при этом указанный способ представляет собой способ подтверждения диагноза заболевания, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), у субъекта с подозрением на наличие заболевания, при котором патологически вовлечены ГМК.
- 5 39. Способ по п. 37 или п. 38, при этом указанный способ дополнительно включает выбор указанного субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.
- 10 40. Способ обеспечения прогноза для субъекта, имеющего заболевание, при котором патологически вовлечены гладкомышечные клетки (ГМК), или с подозрением на наличие указанного заболевания, при этом указанный способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более генетических факторов у указанного субъекта, позволяющих прогнозировать повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или повышение опосредованной IL-11 передачи сигналов.
- 15 41. Способ по любому из пп. 35-40, где указанное заболевание представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечены секреторные ГМК.

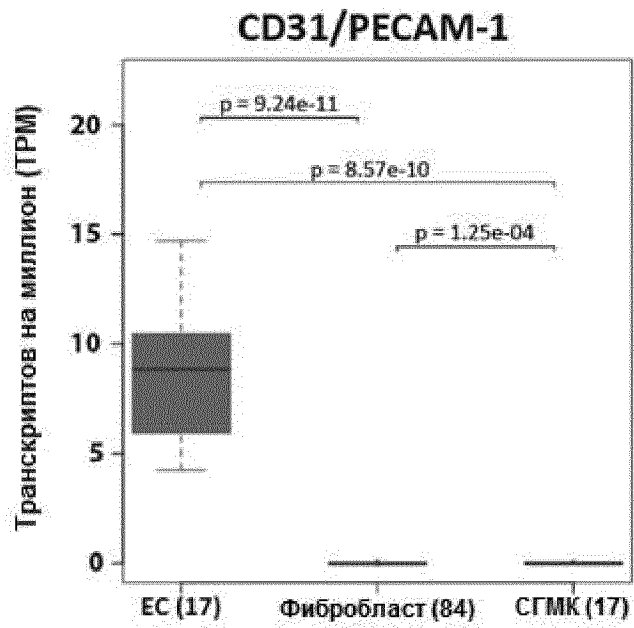


Фиг. 1

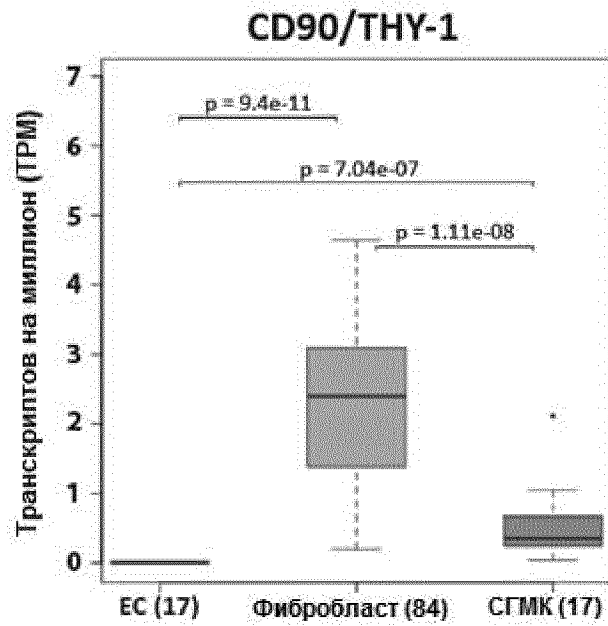
**РСА - все контрольные образцы**



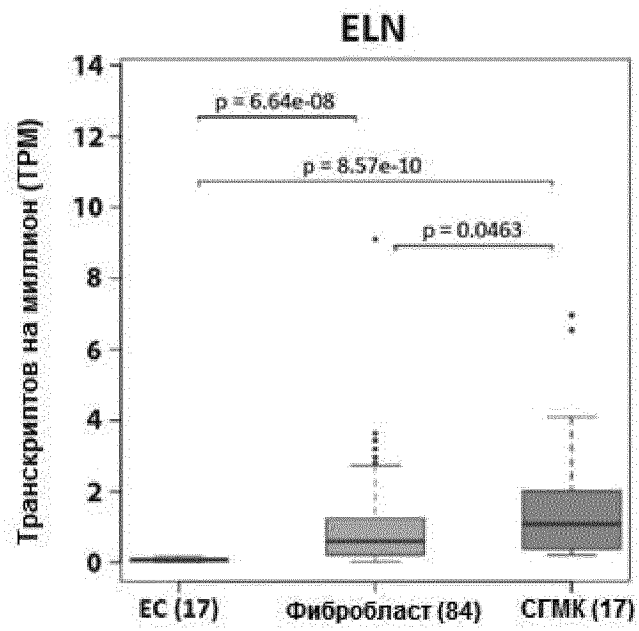
Фиг. 2



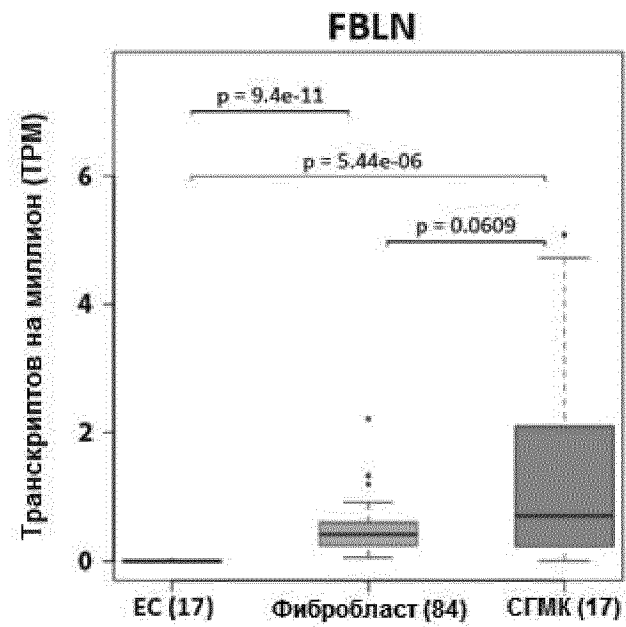
Фиг. 3А



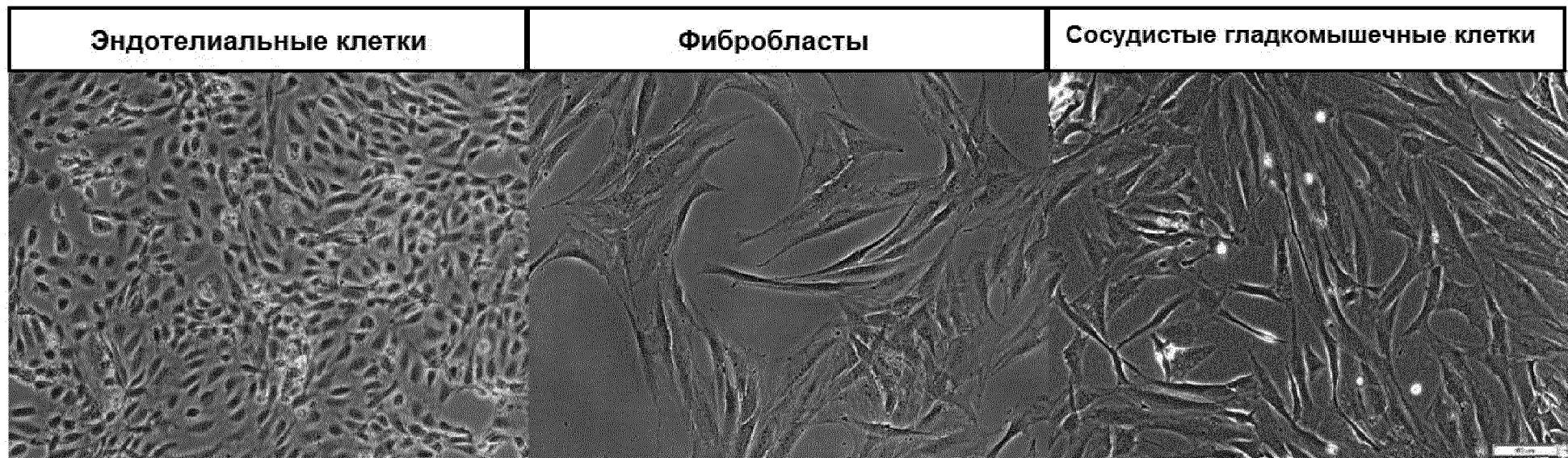
Фиг. 3В



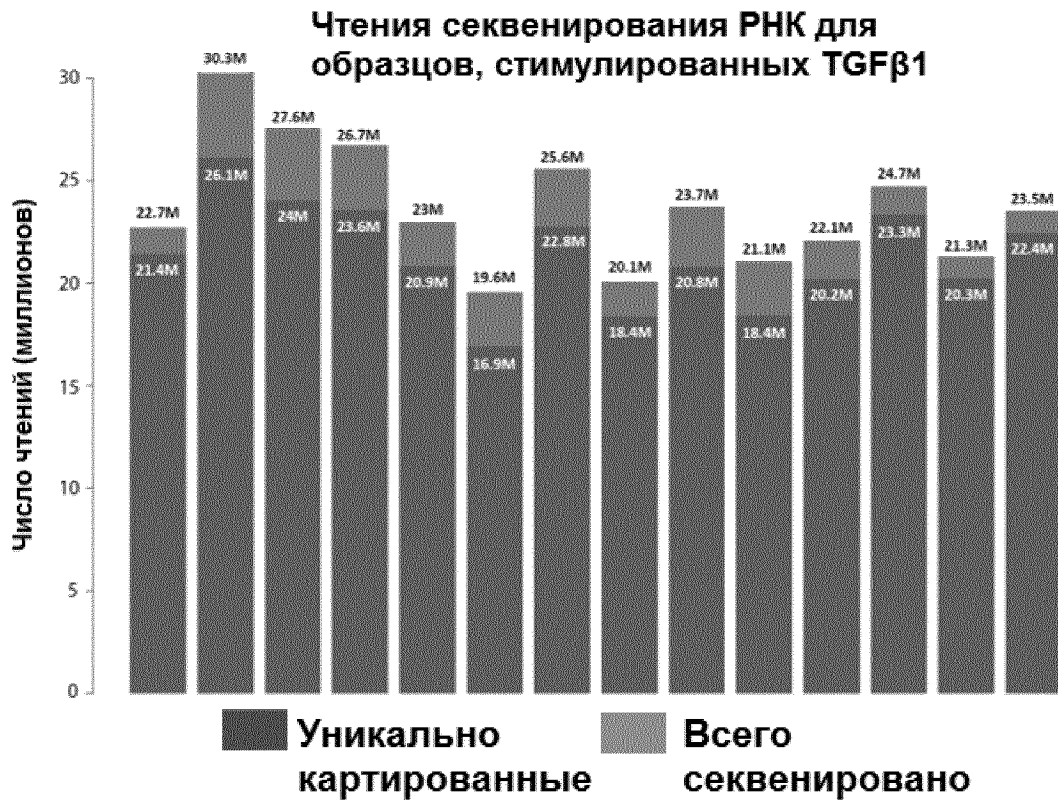
Фиг. 3С



Фиг. 3D



Фиг. 4

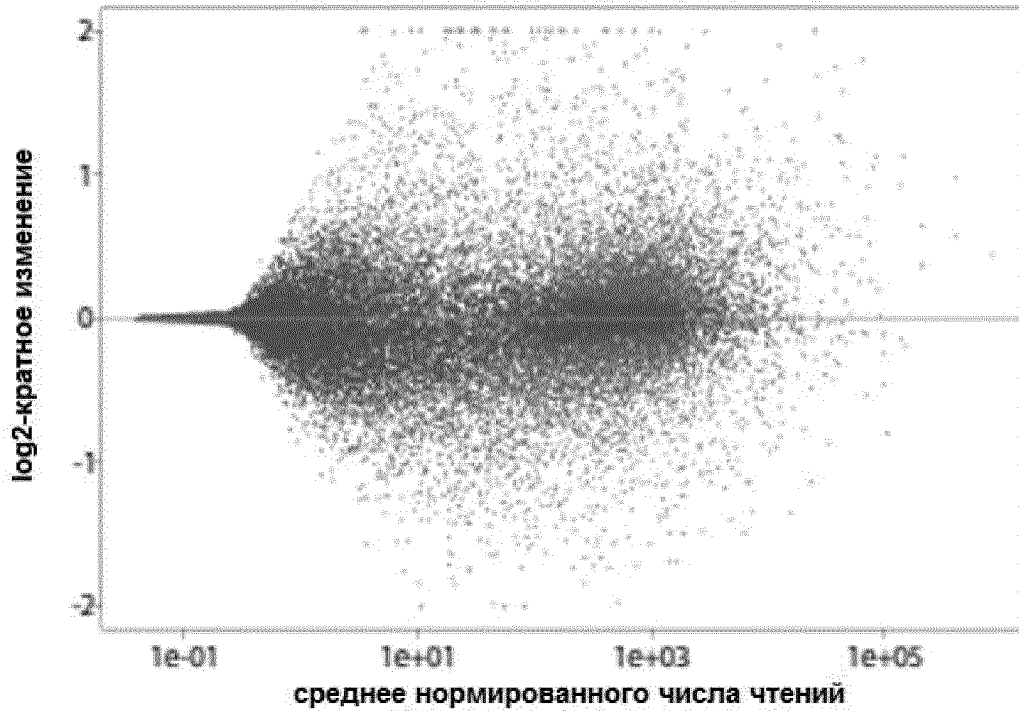


Фиг. 5



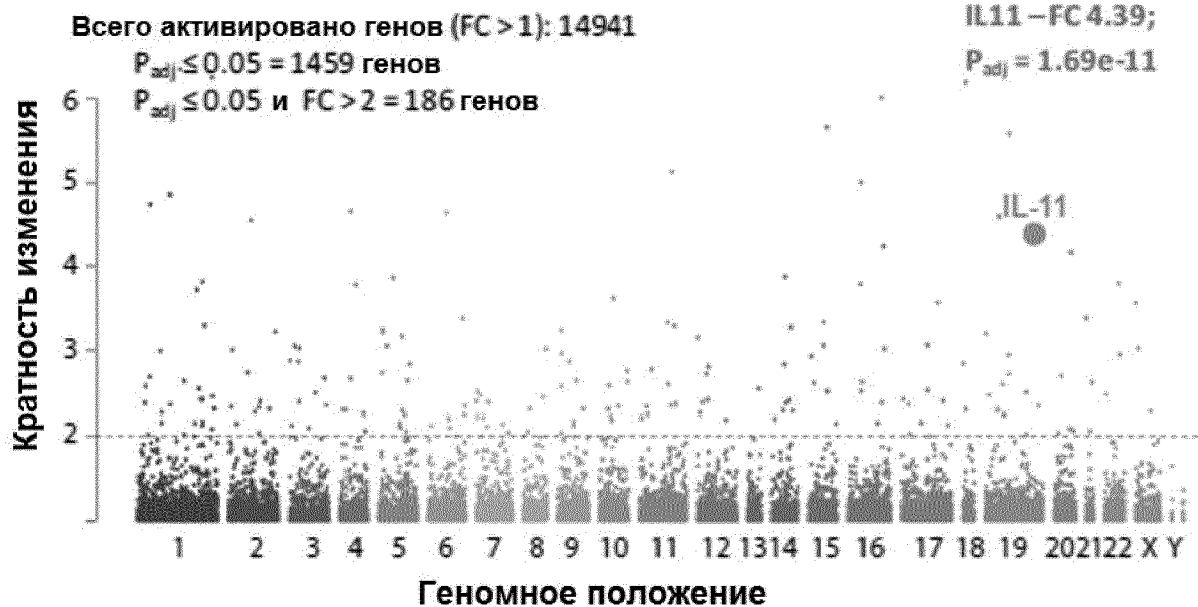
Фиг. 6А

### МА-график: LIMA, TGFβ1 по сравнению с контролем



Фиг. 6В

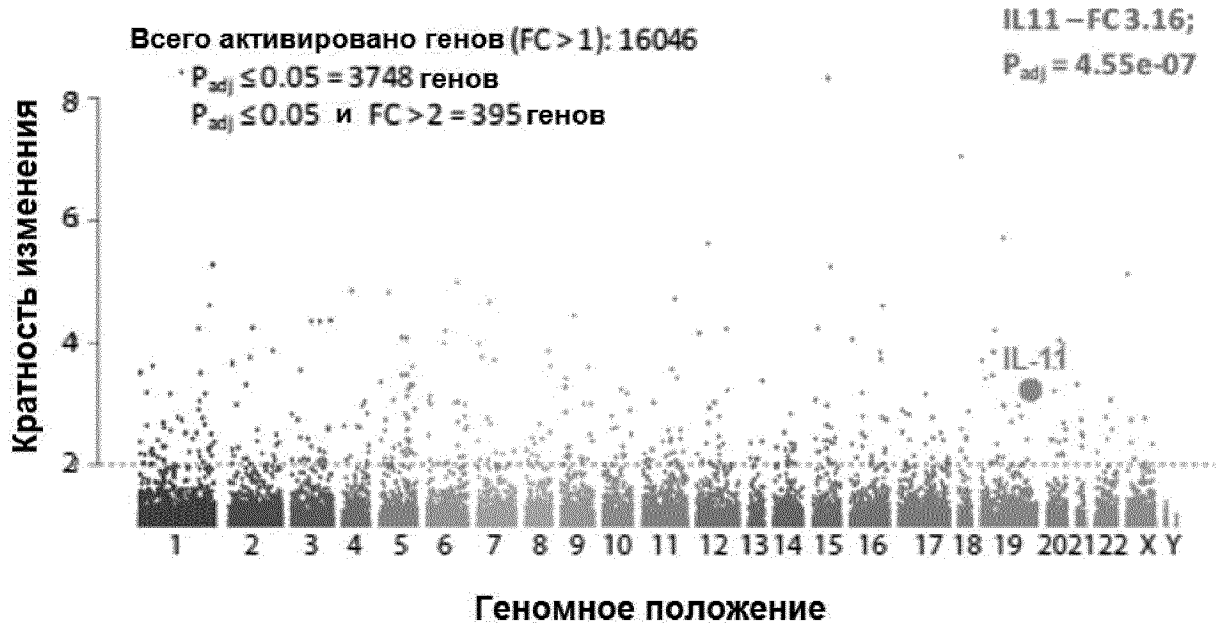
### Аортальная пуговица, стимуляция TGFβ1



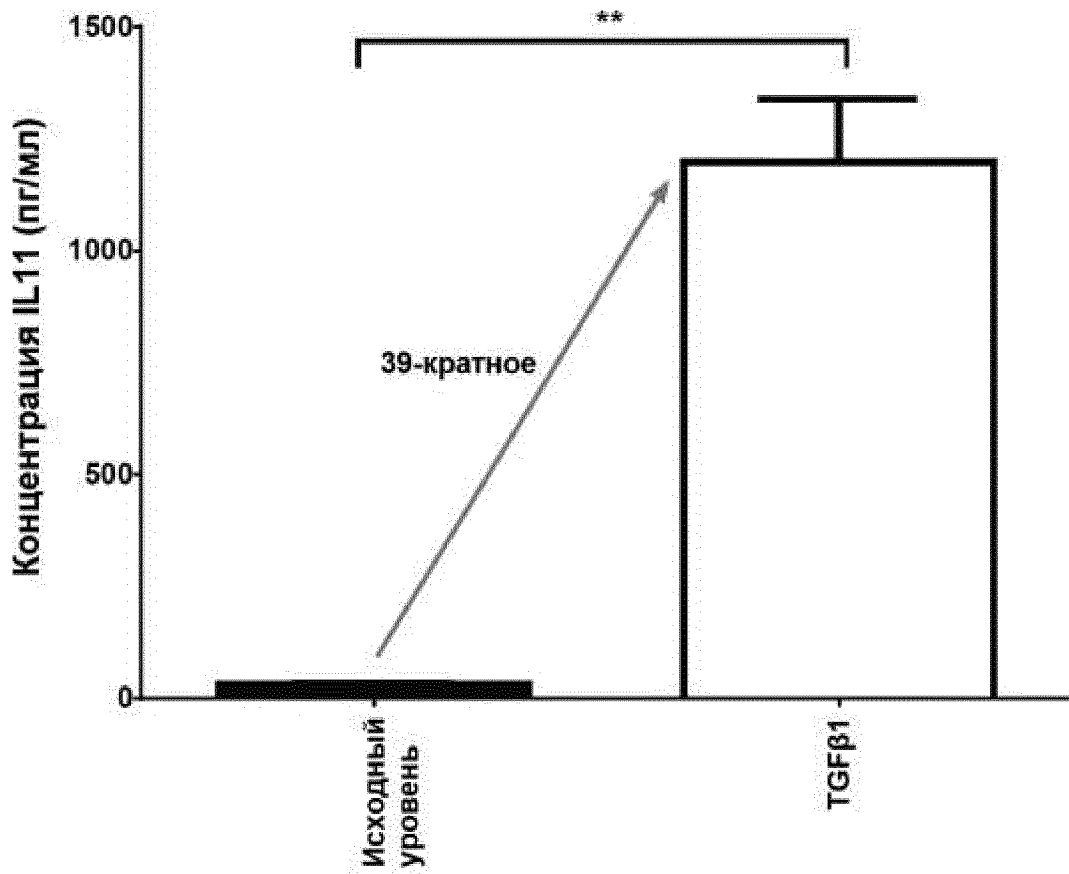
Фиг. 6С



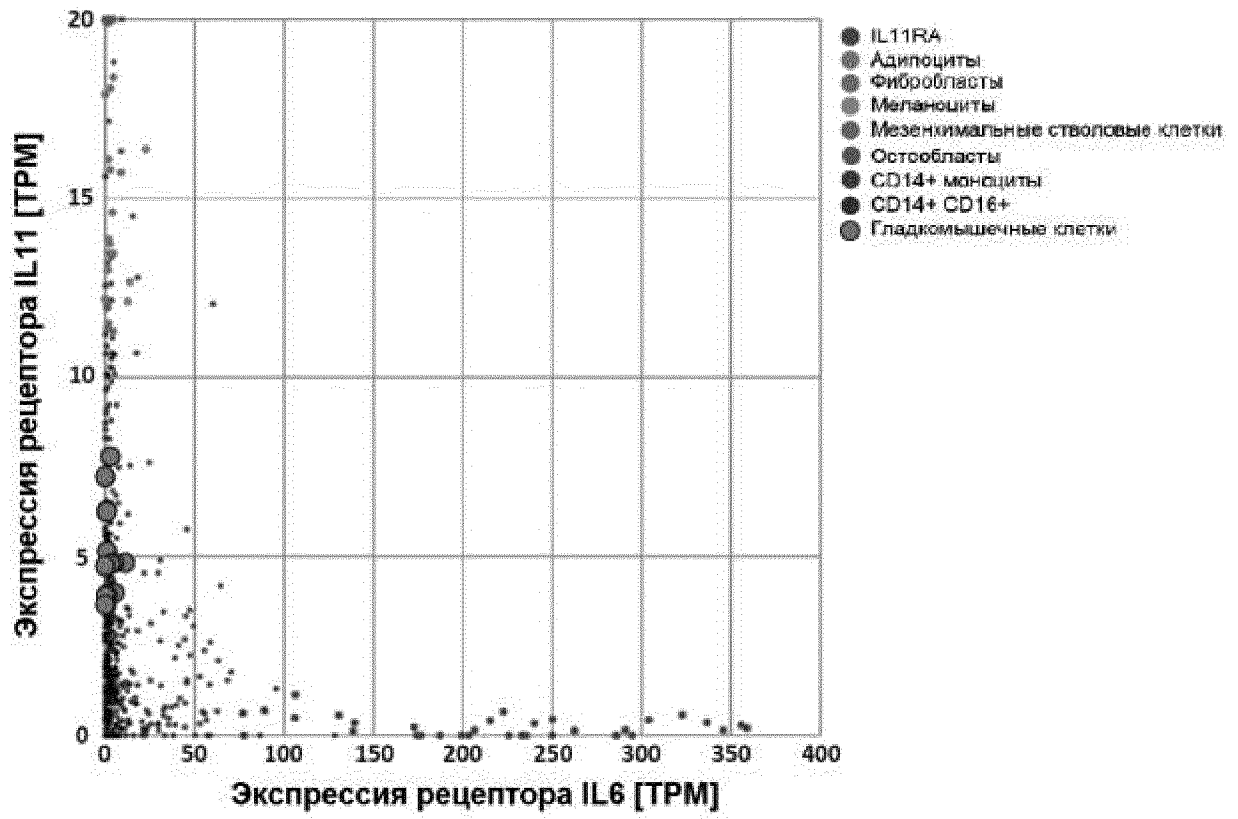
## LIMA, стимуляция TGFβ1



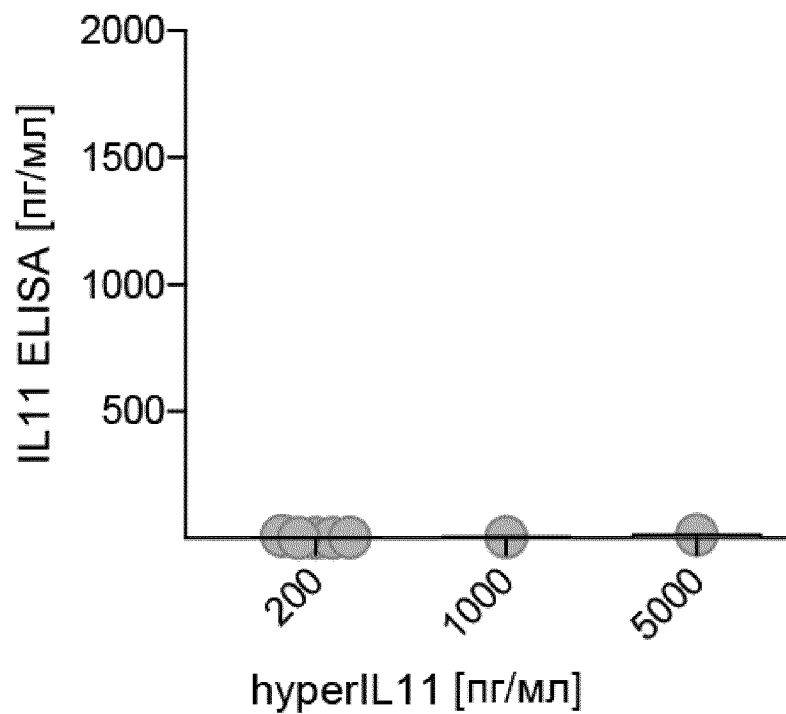
Фиг. 6D



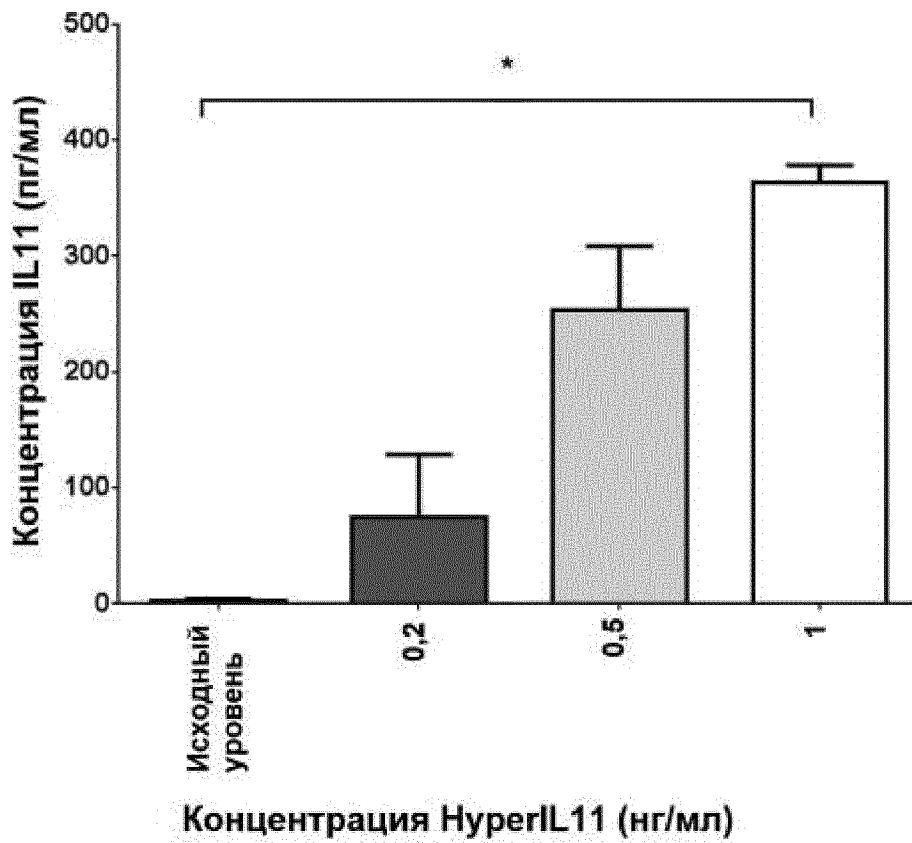
Фиг. 7



Фиг. 8

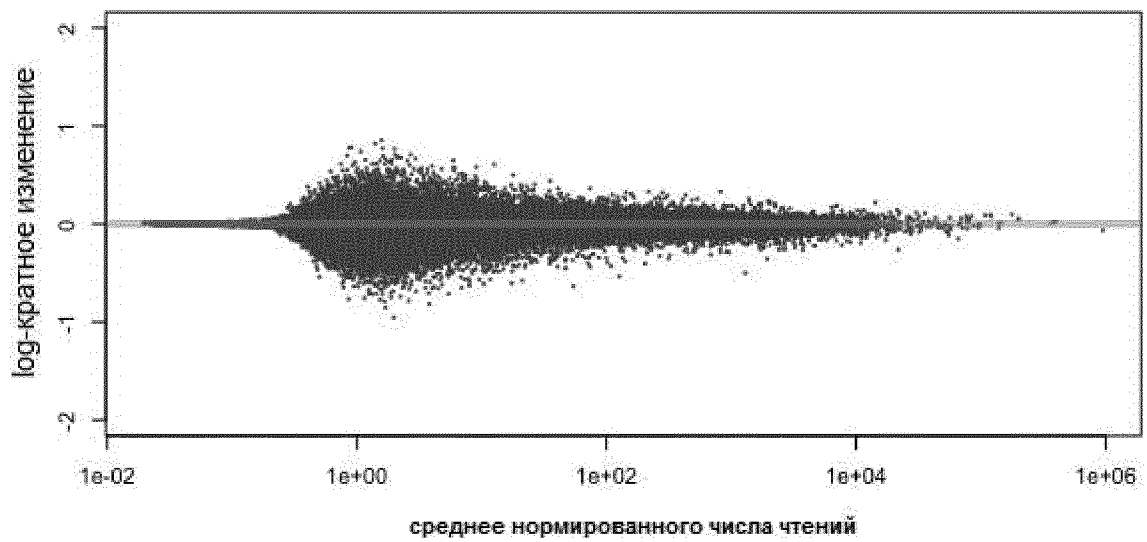


Фиг. 9

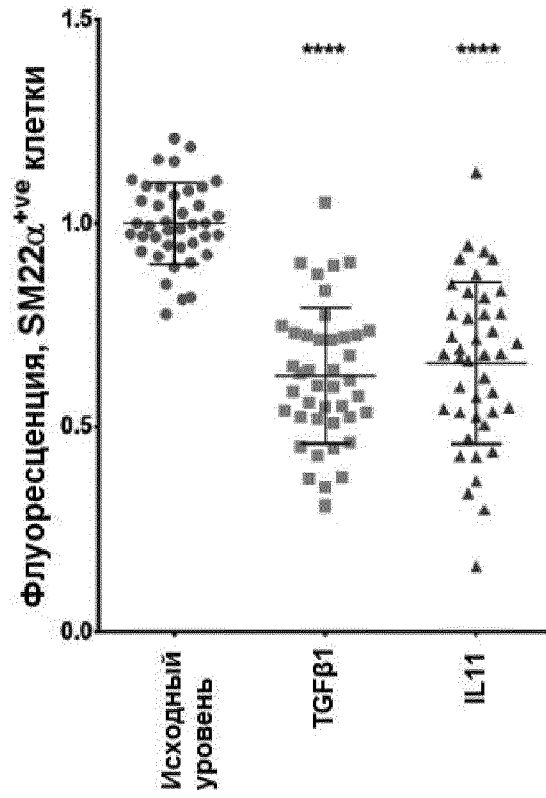


Фиг. 10

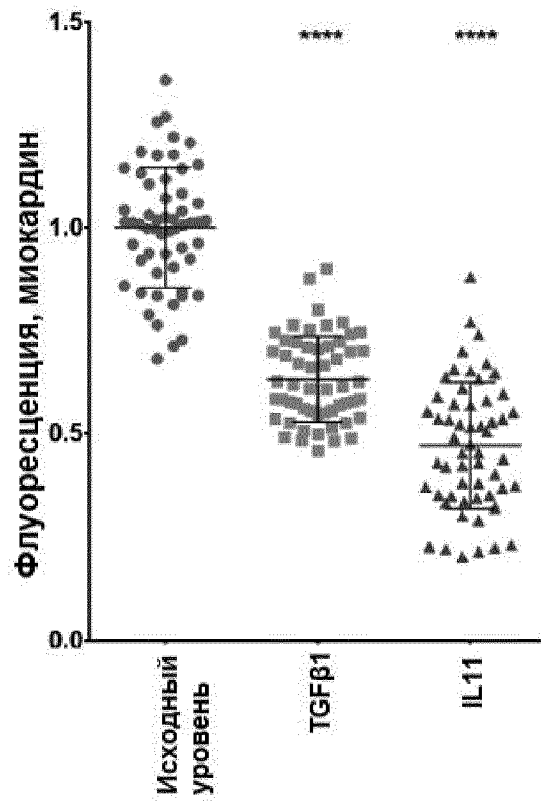
МА-график: IL11 по сравнению с контролем



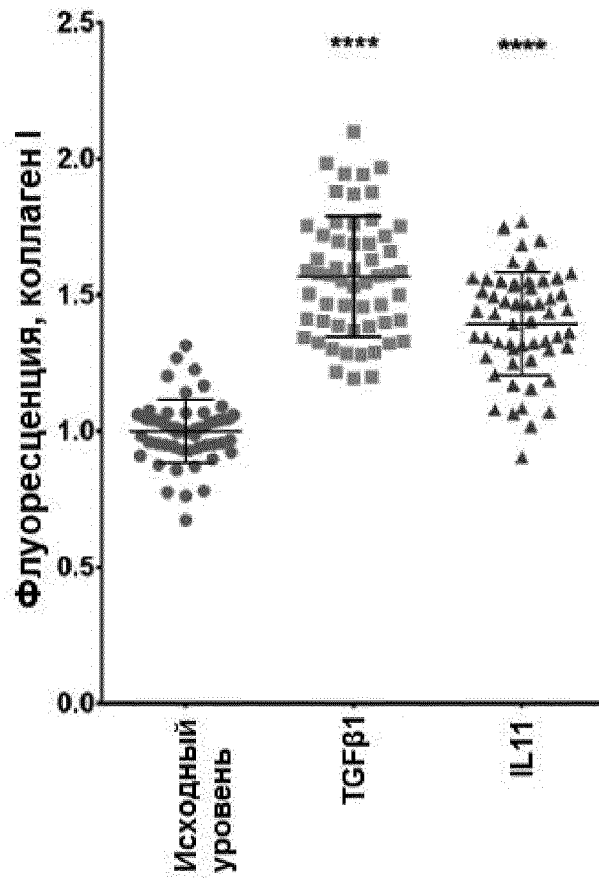
Фиг. 11



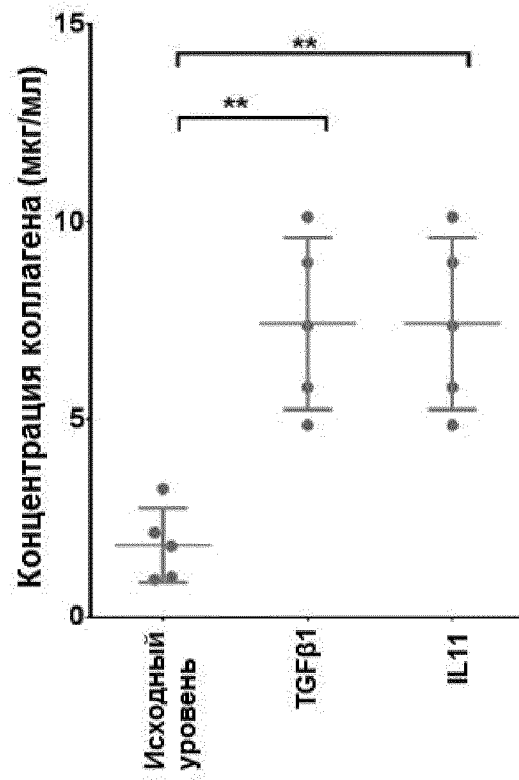
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 12С



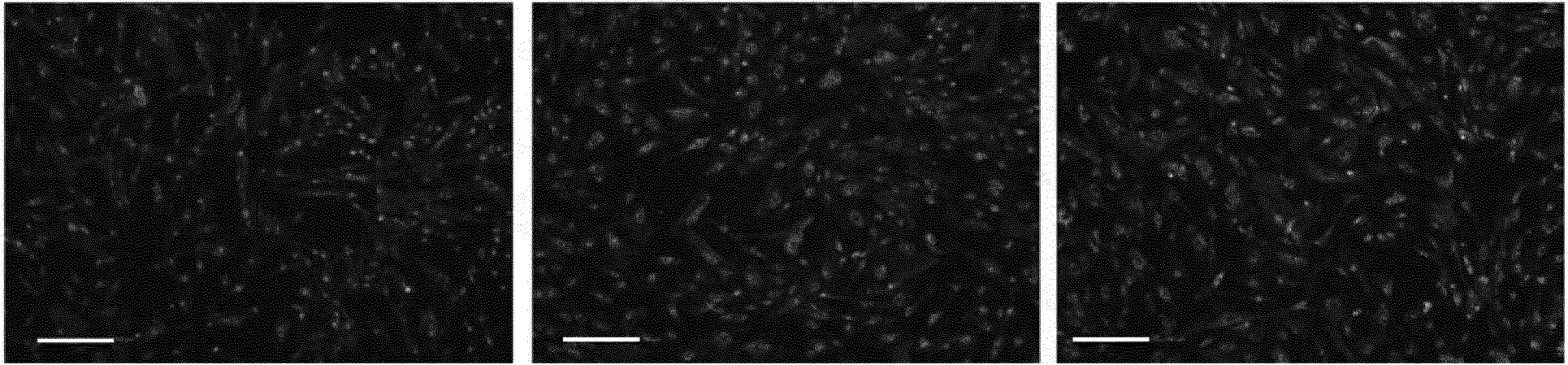
Фиг. 12D

# Col I / Rhod / DAPI

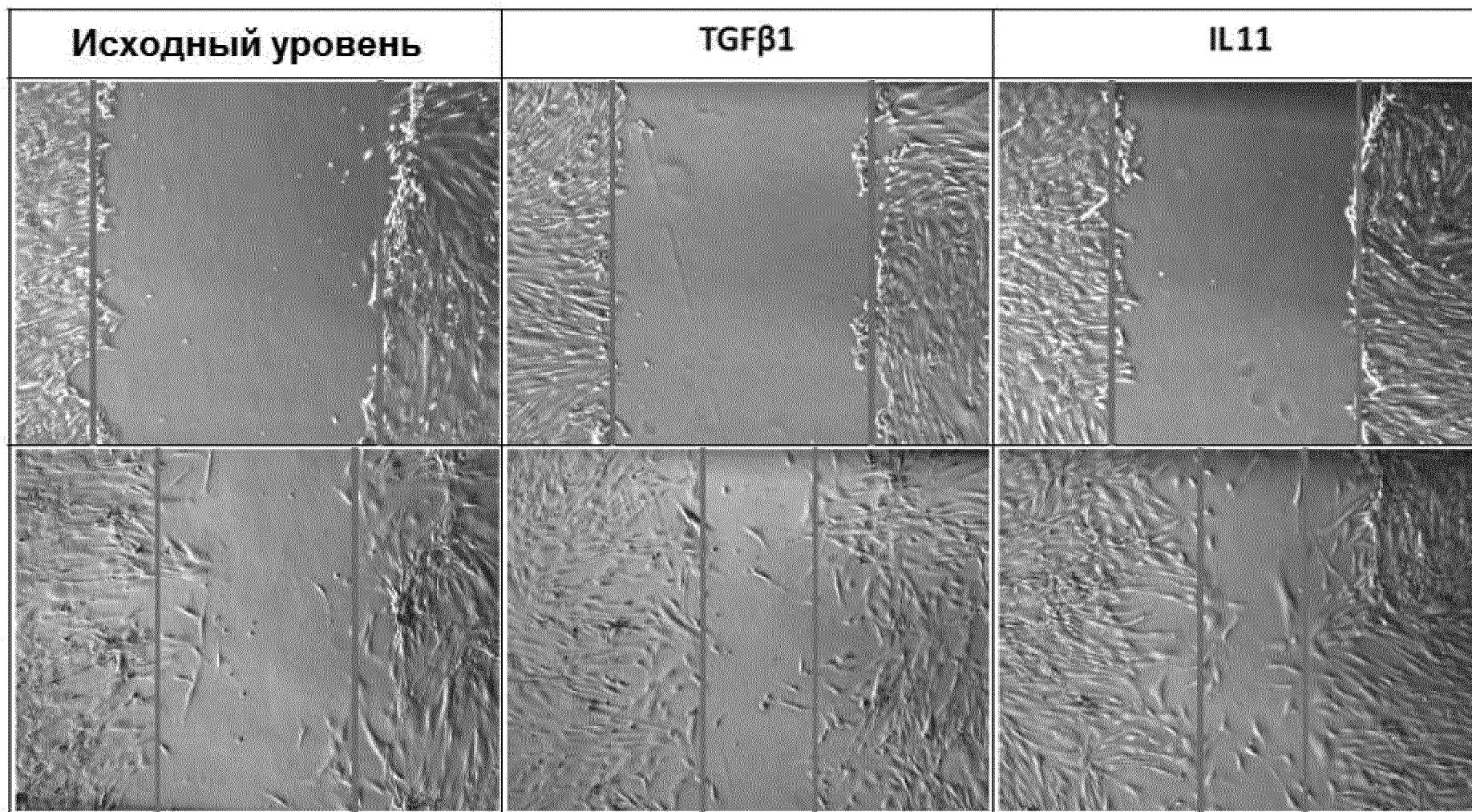
Исходный уровень

TGFβ1

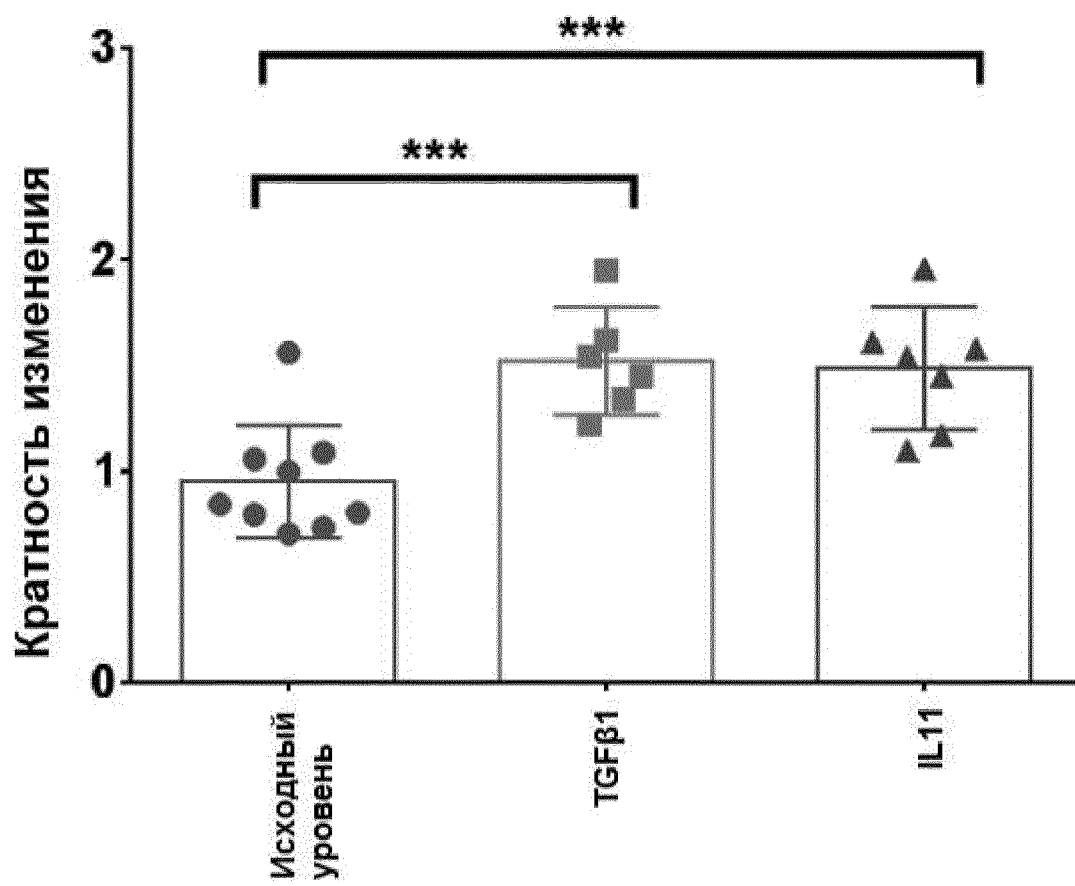
IL11



Фиг. 12E



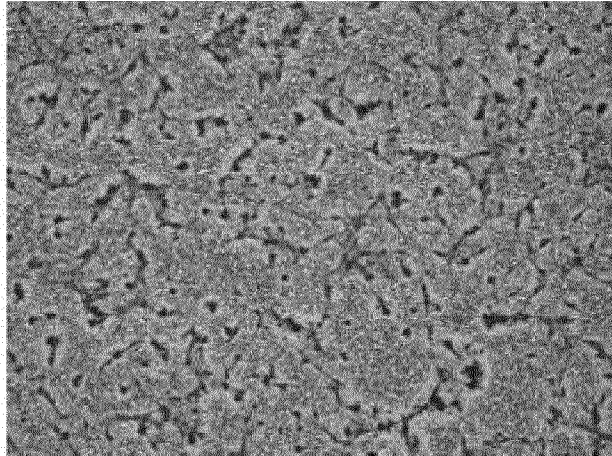
Фиг. 13А



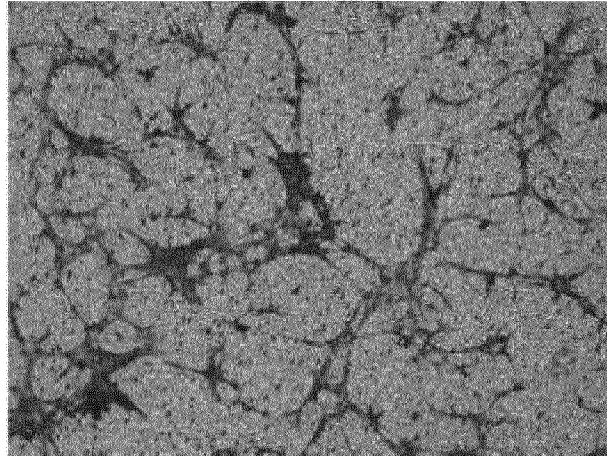
Фиг. 13В



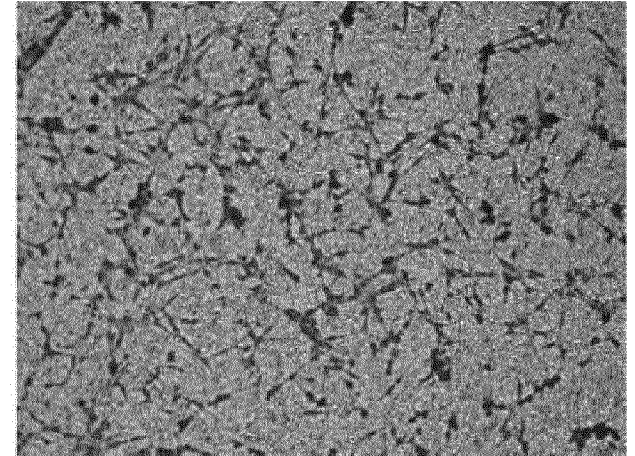
**Исходный уровень**



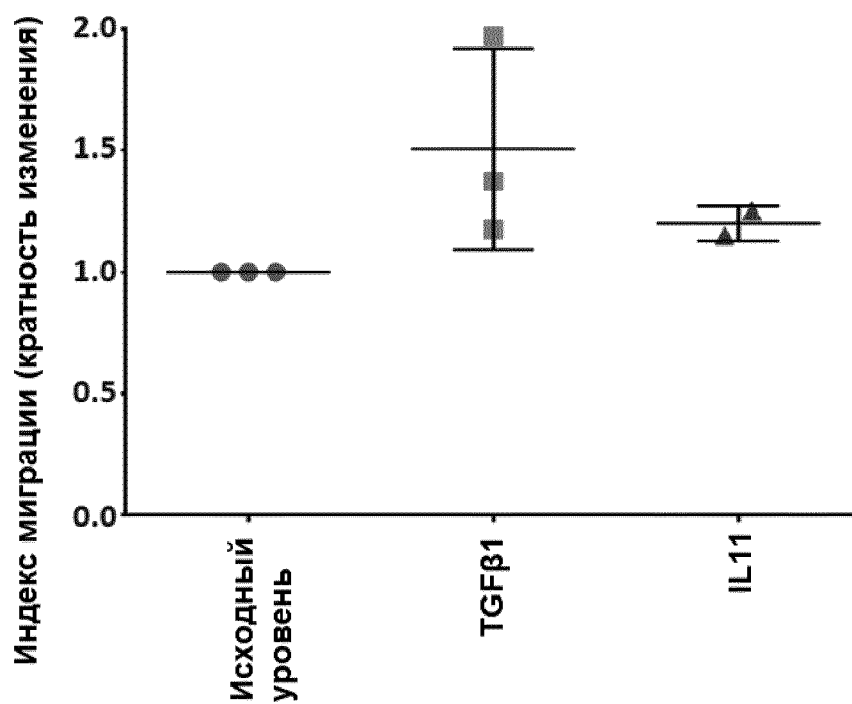
**TGFβ1**



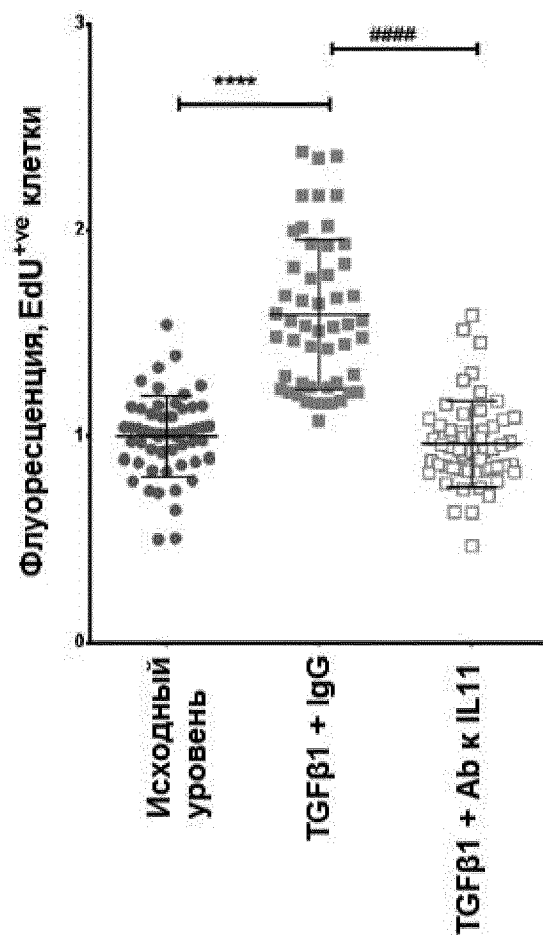
**IL11**



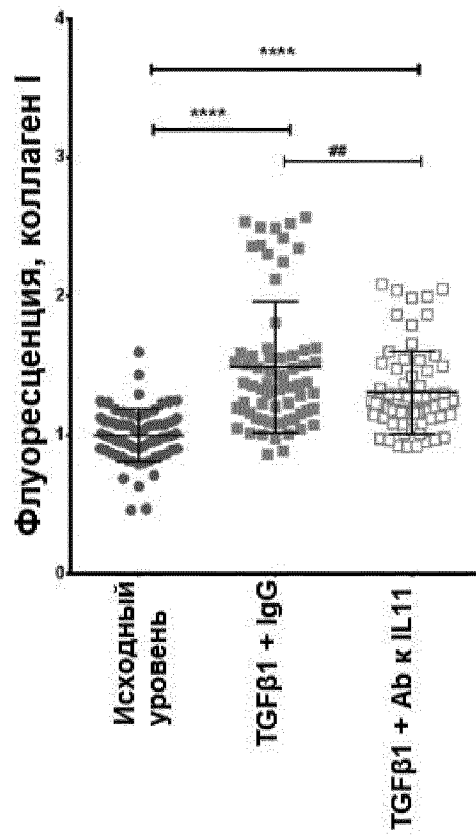
Фиг. 14А



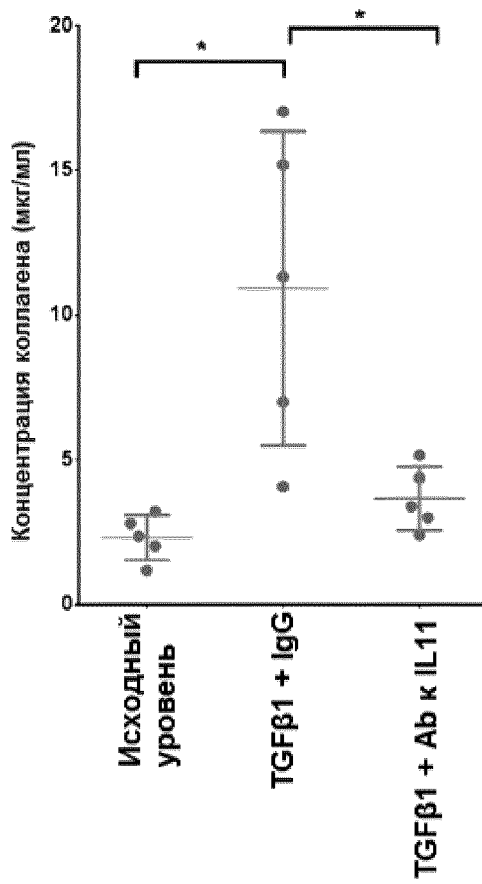
Фиг. 14В



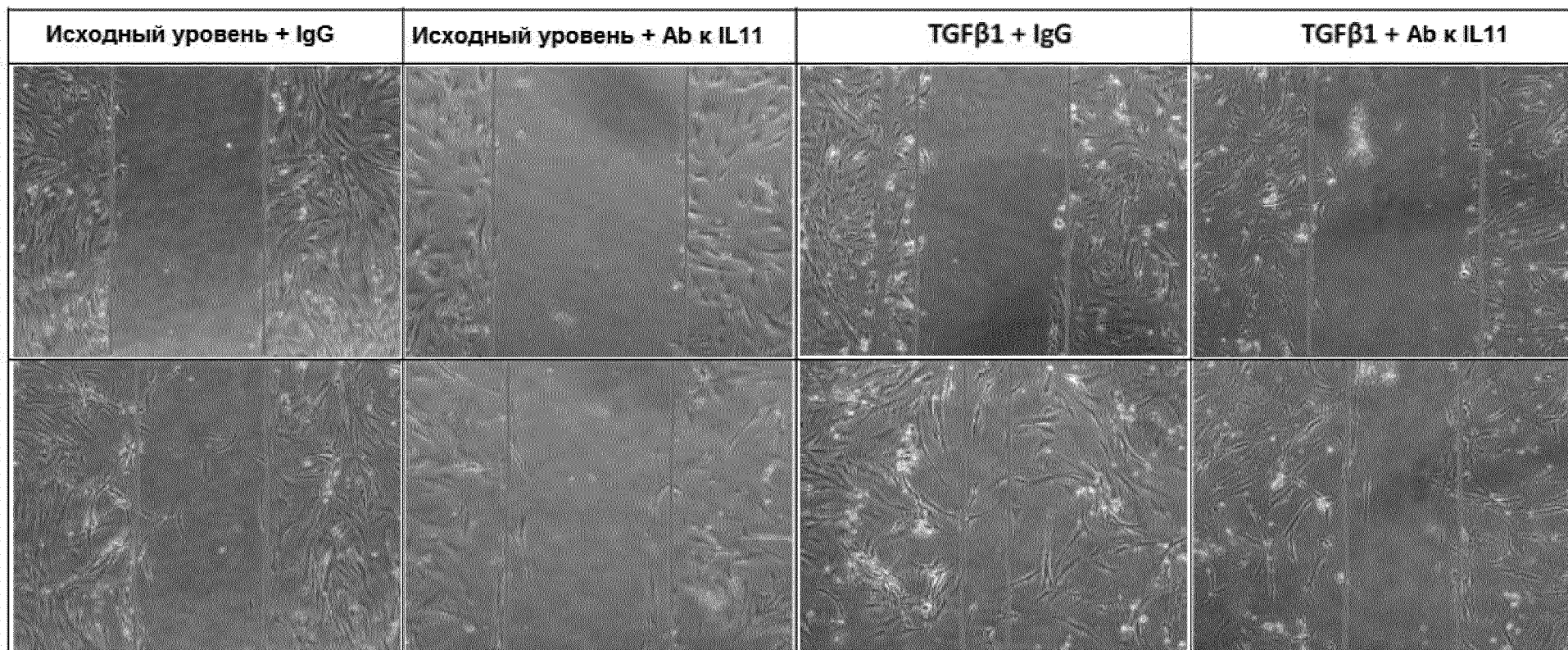
Фиг. 15А



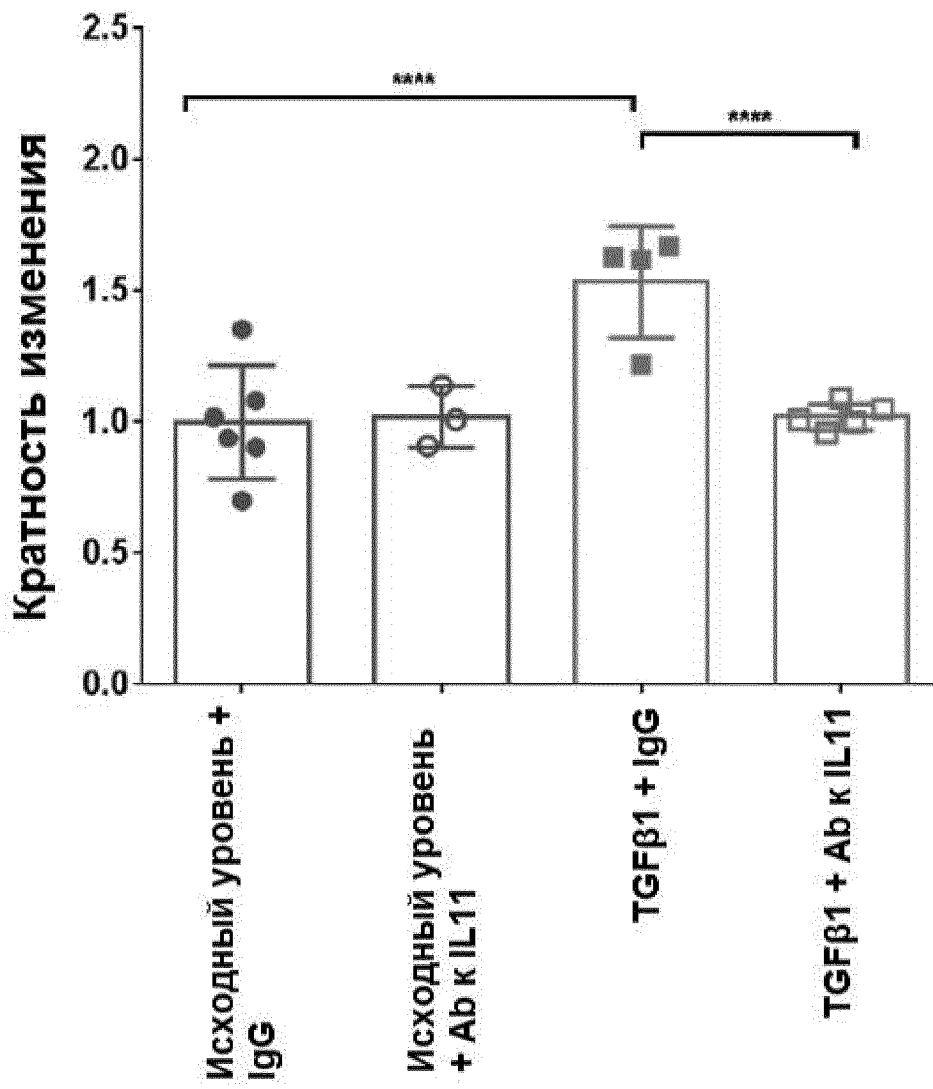
Фиг. 15В



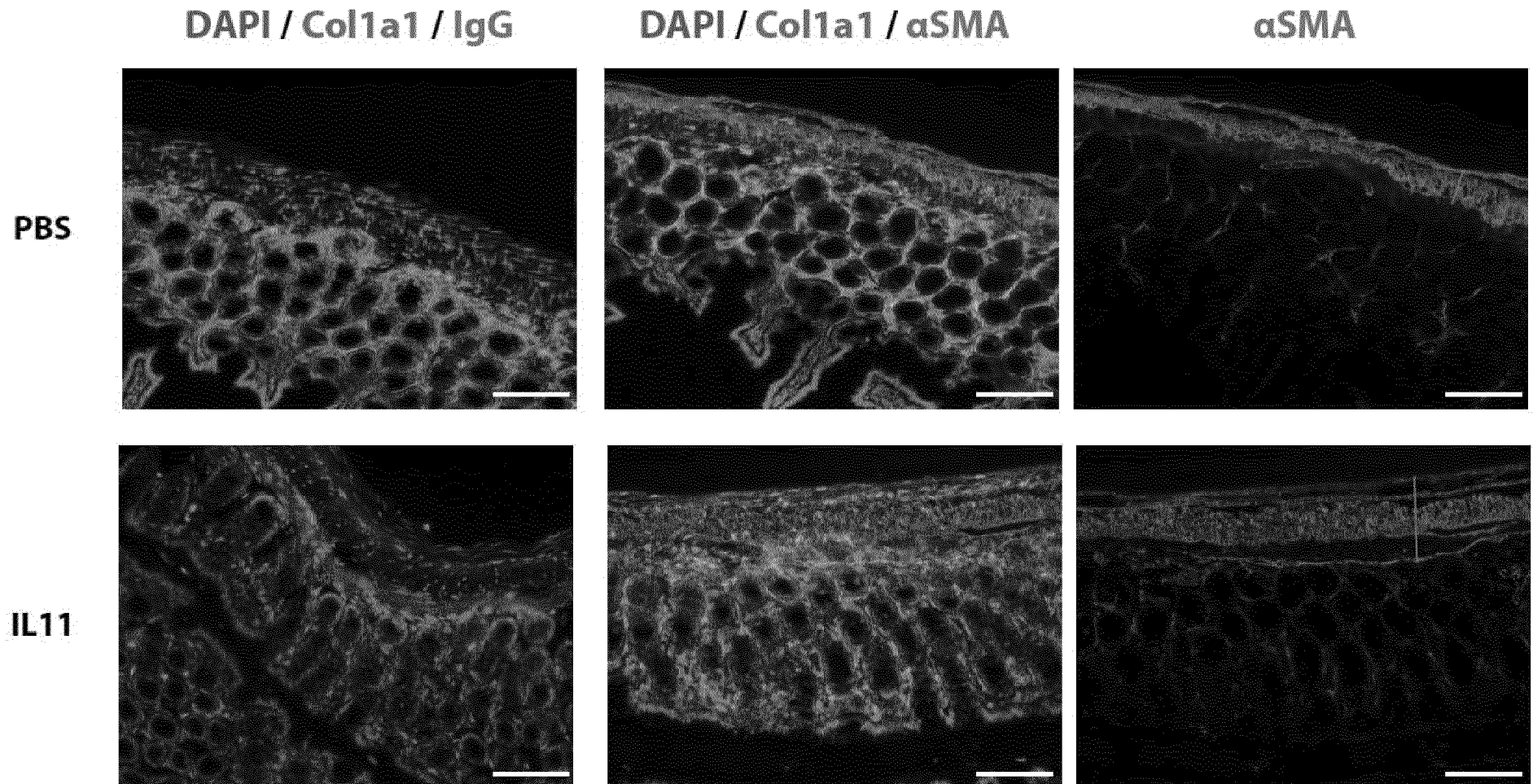
Фиг. 15С



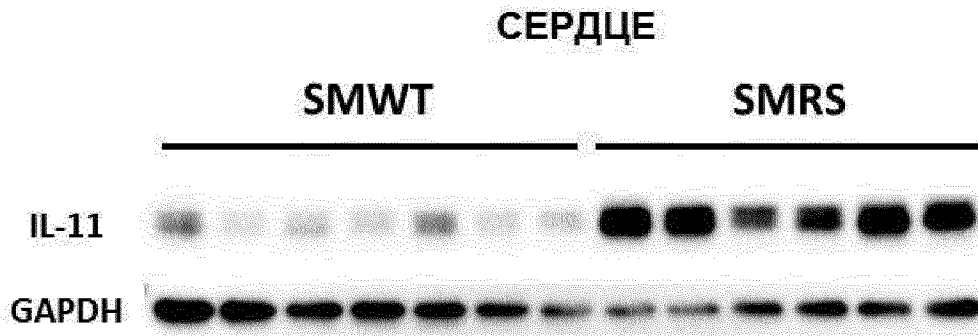
Фиг. 16А



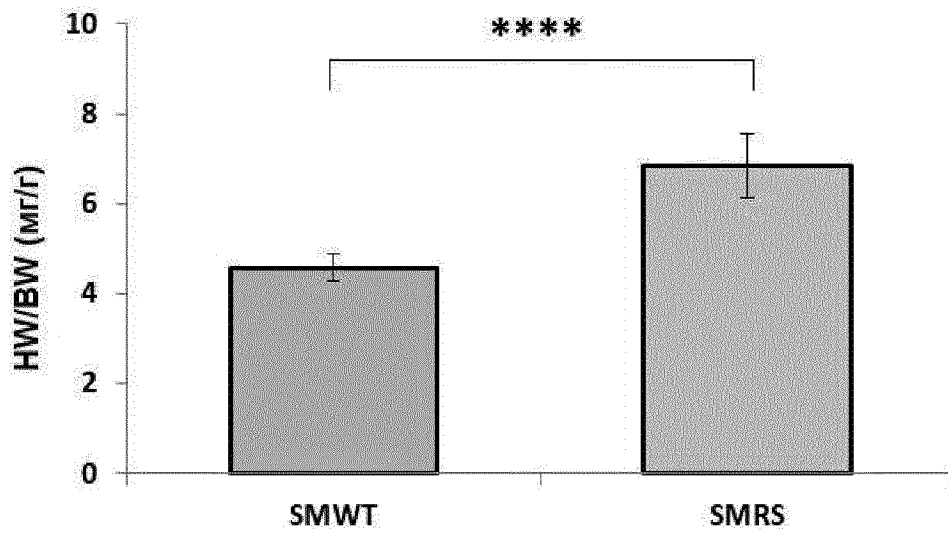
Фиг. 16В



Фиг. 17



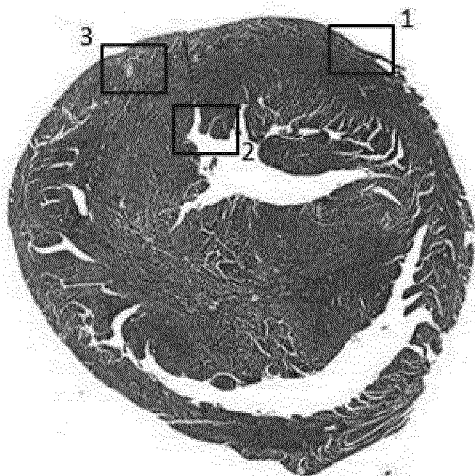
Фиг. 18А



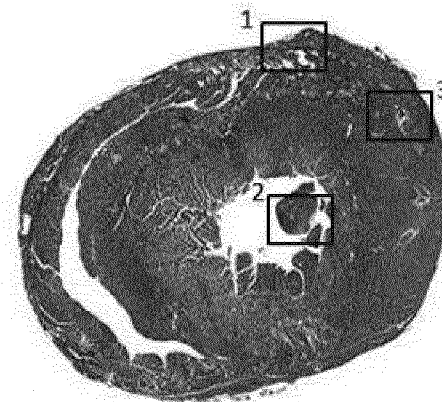
Фиг. 18В



SMWT



SMRS



Эпителий

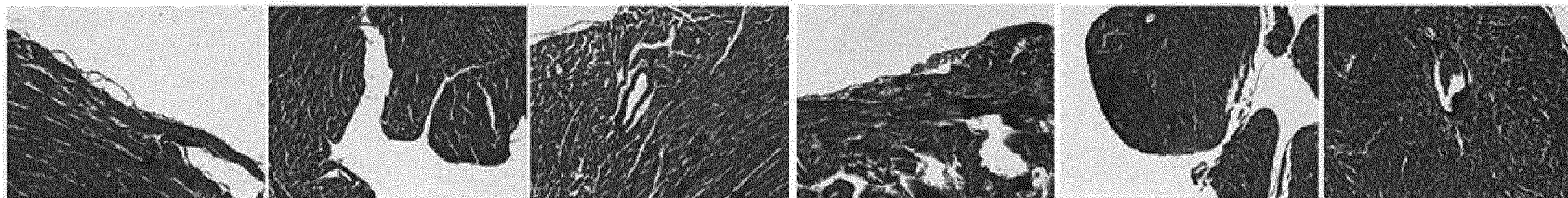
Эндотелий

Периваскулярные

Эпителий

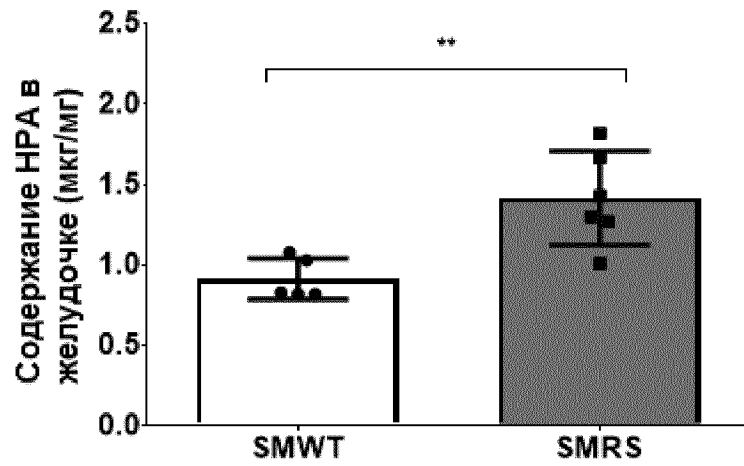
Эндотелий

Периваскулярные

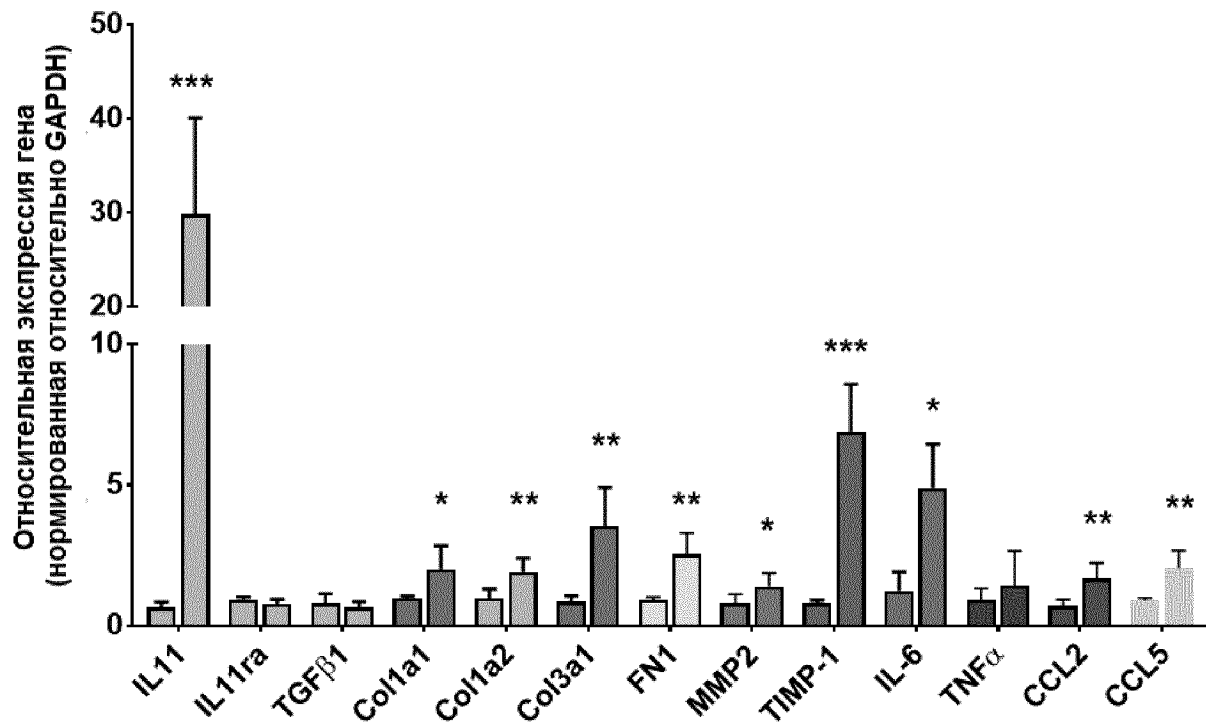


Фиг. 18С

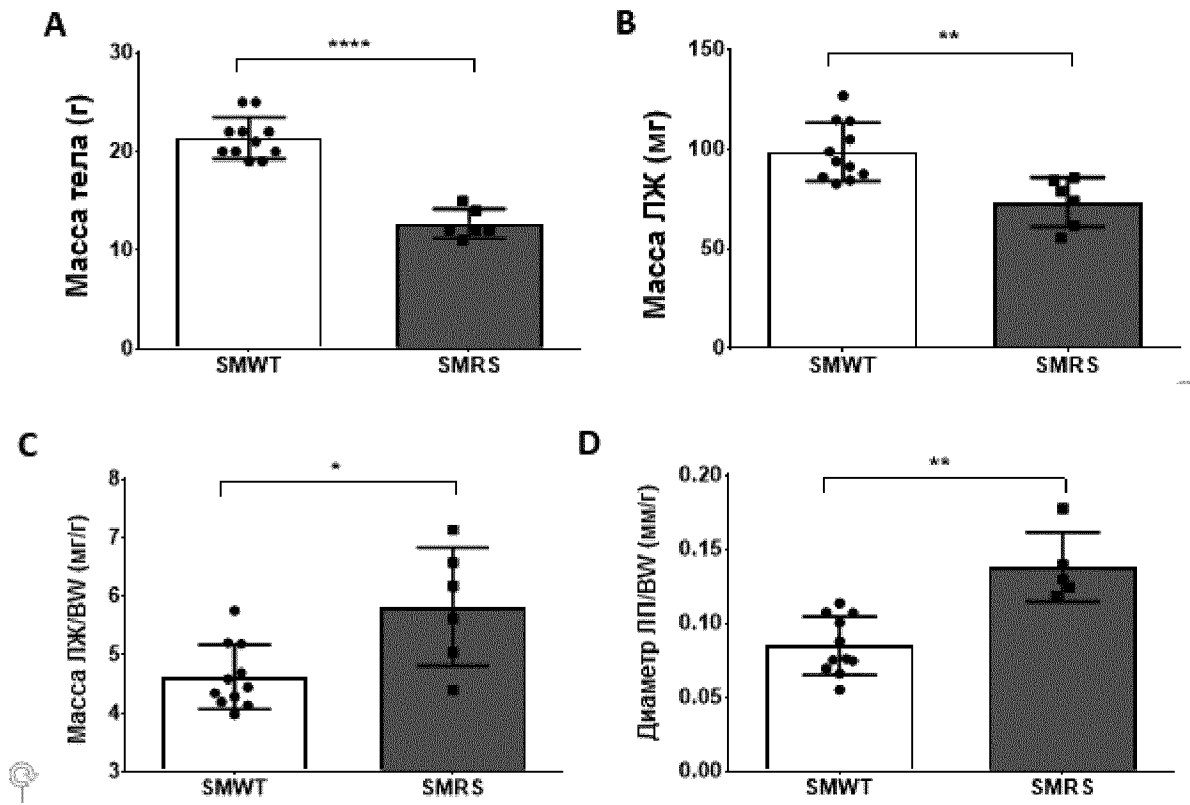




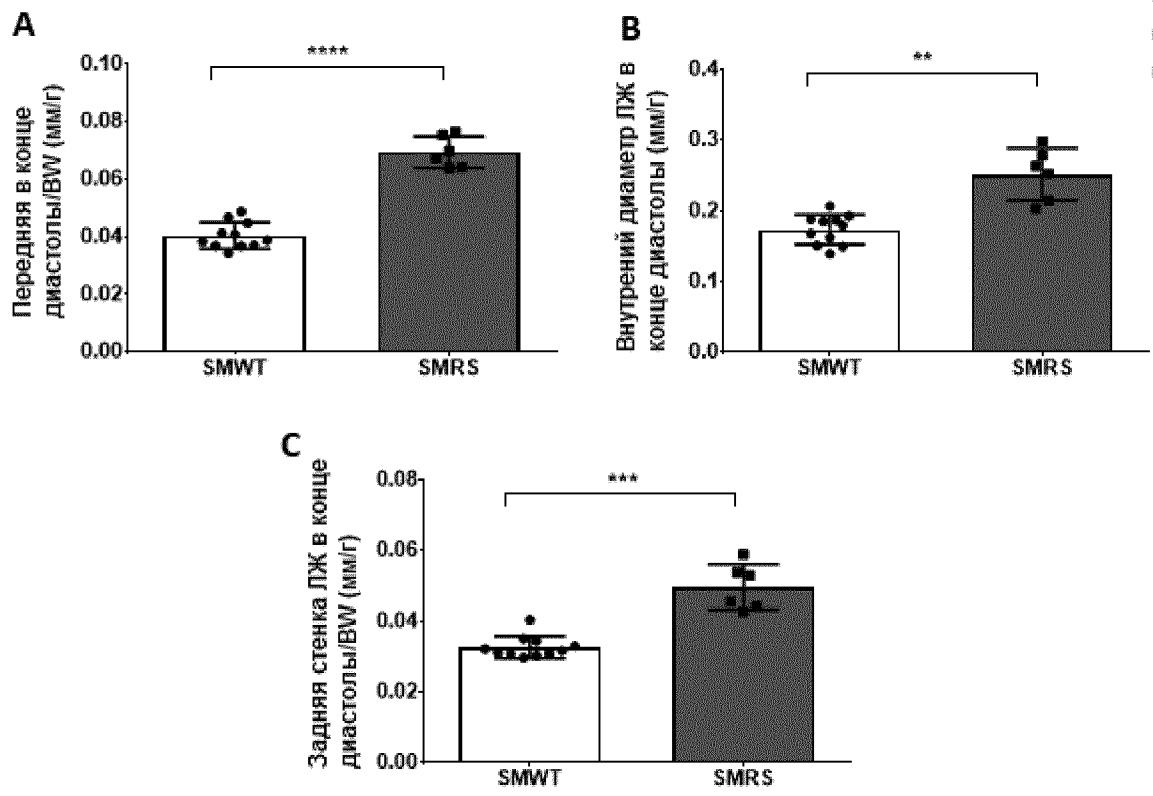
Фиг. 18D



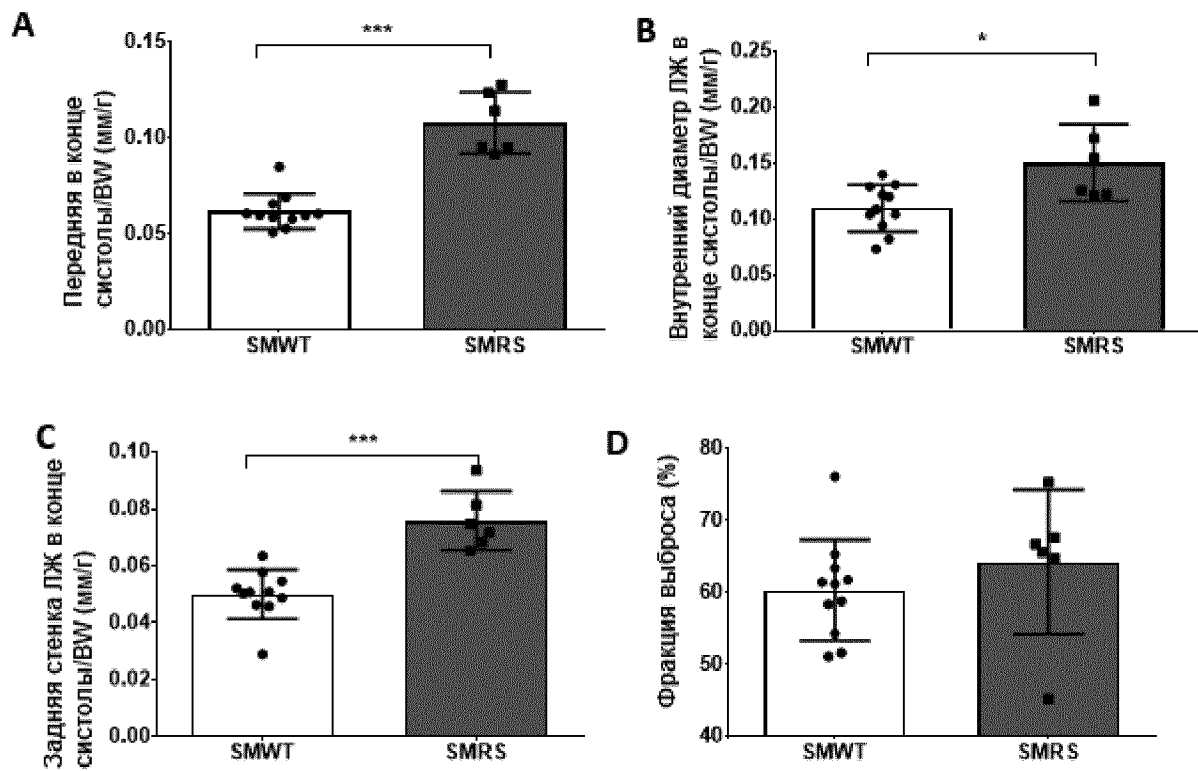
Фиг. 18E



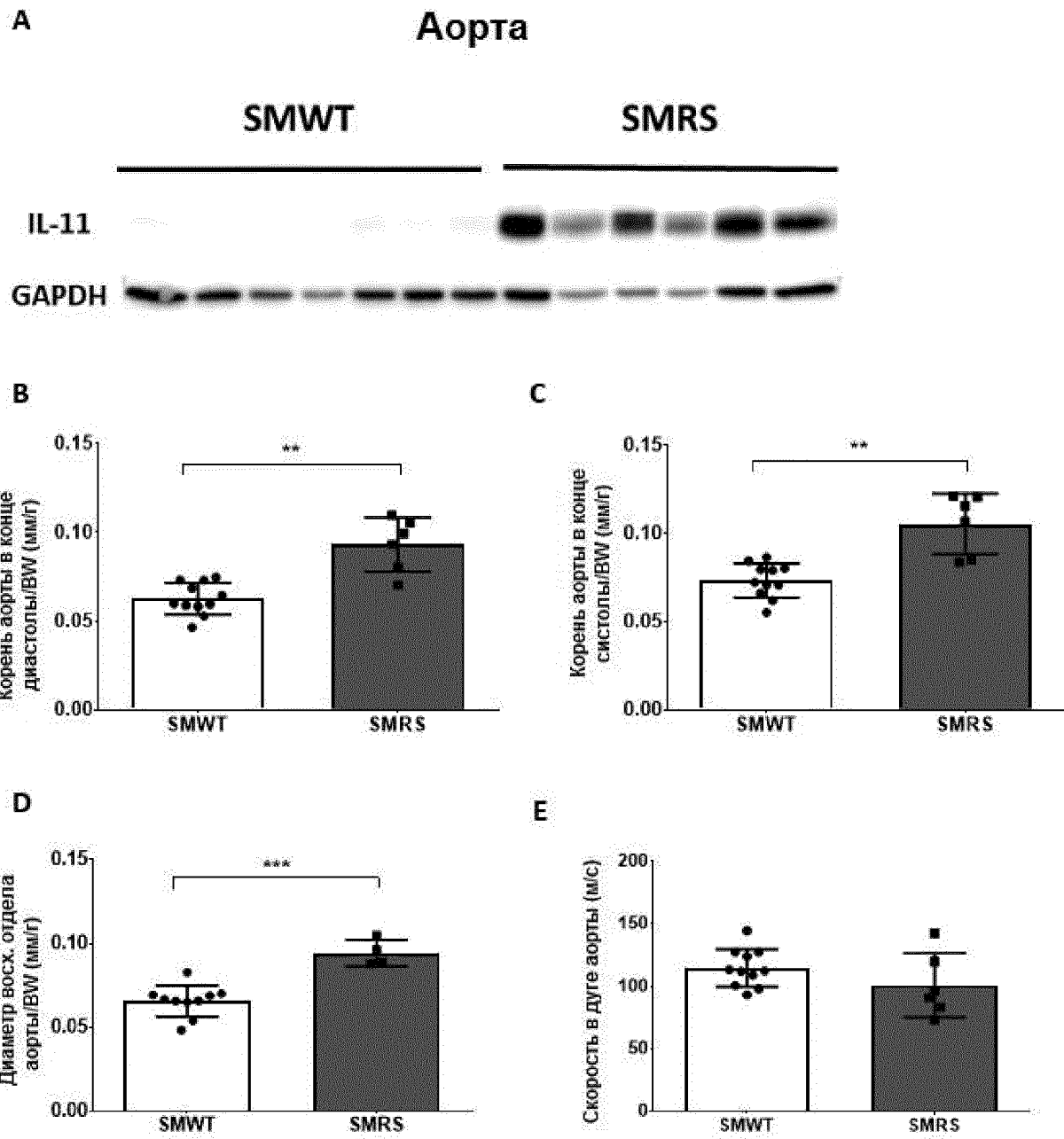
Фиг. 19



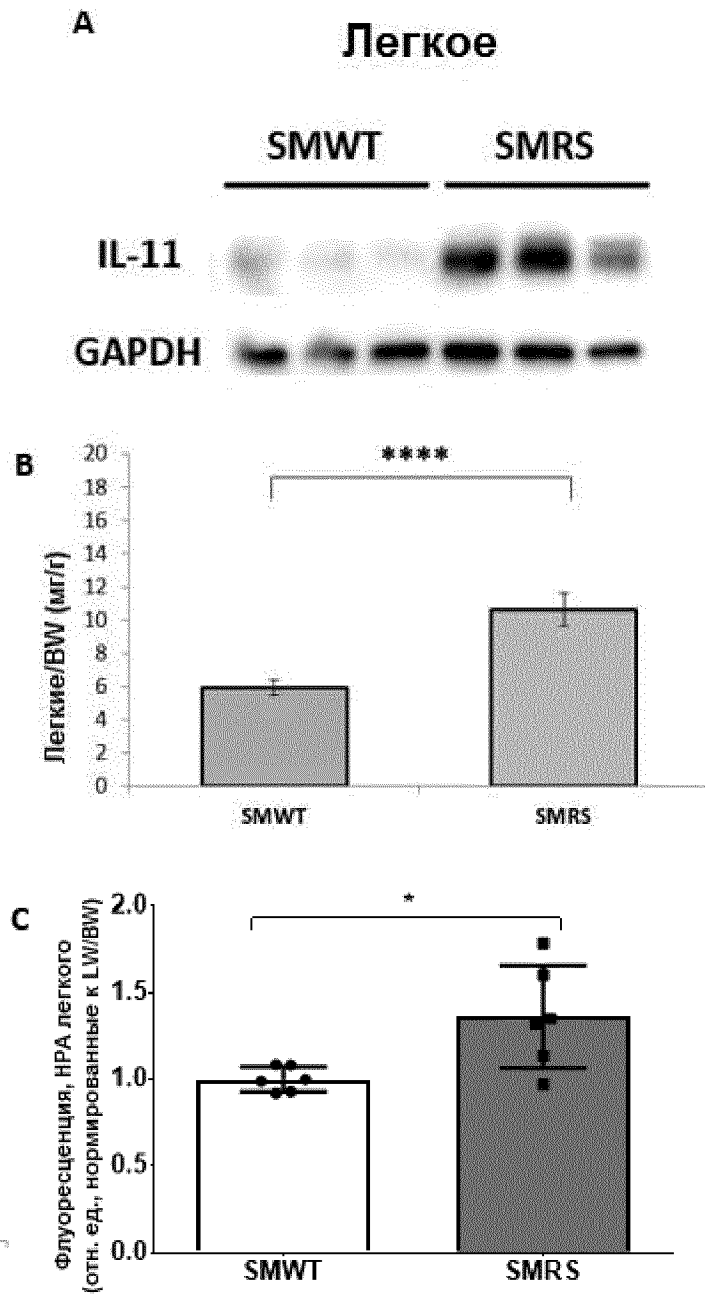
Фиг. 20



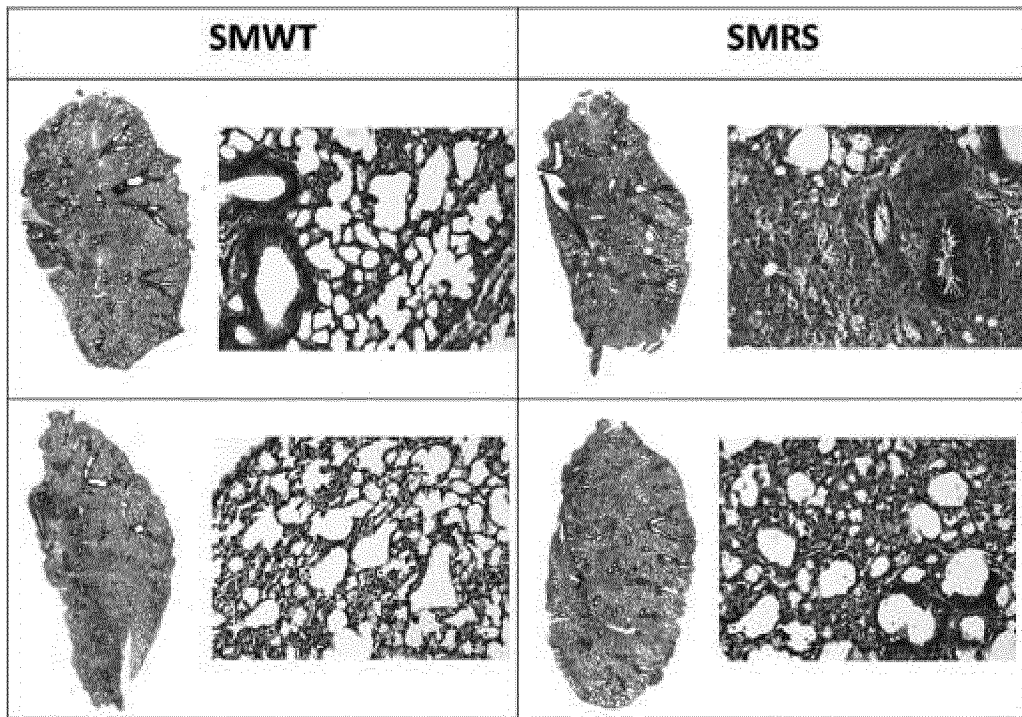
Фиг. 21



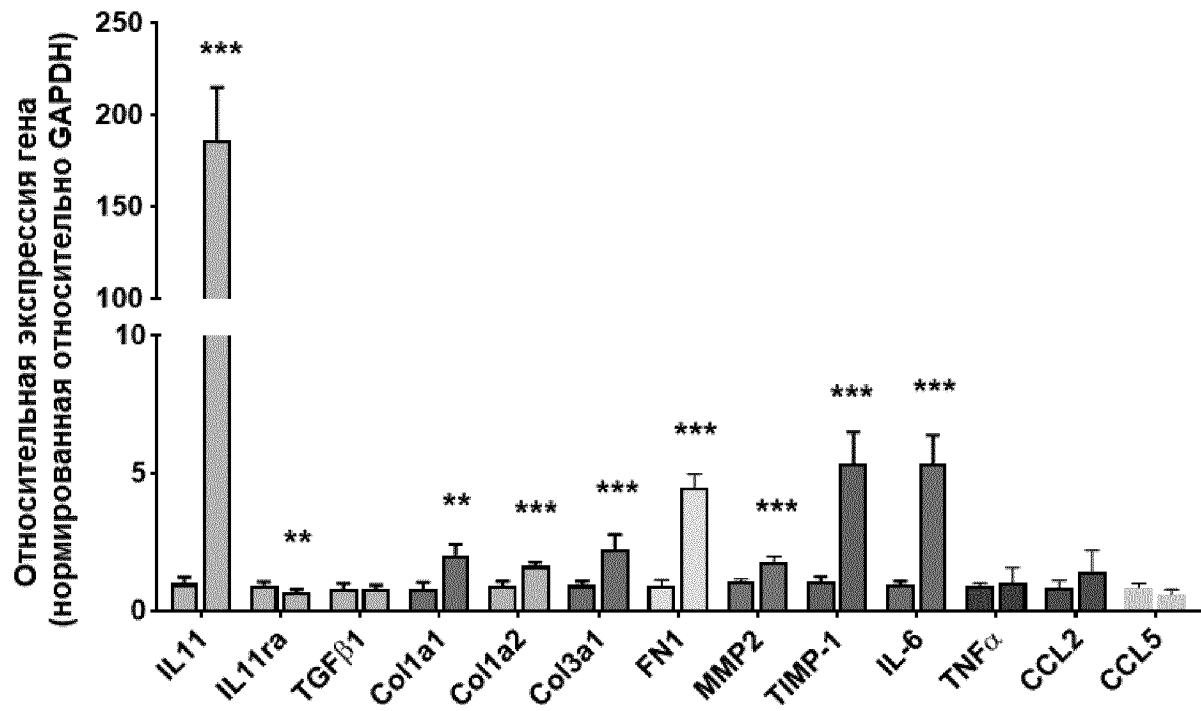
Фиг. 22



Фиг. 23

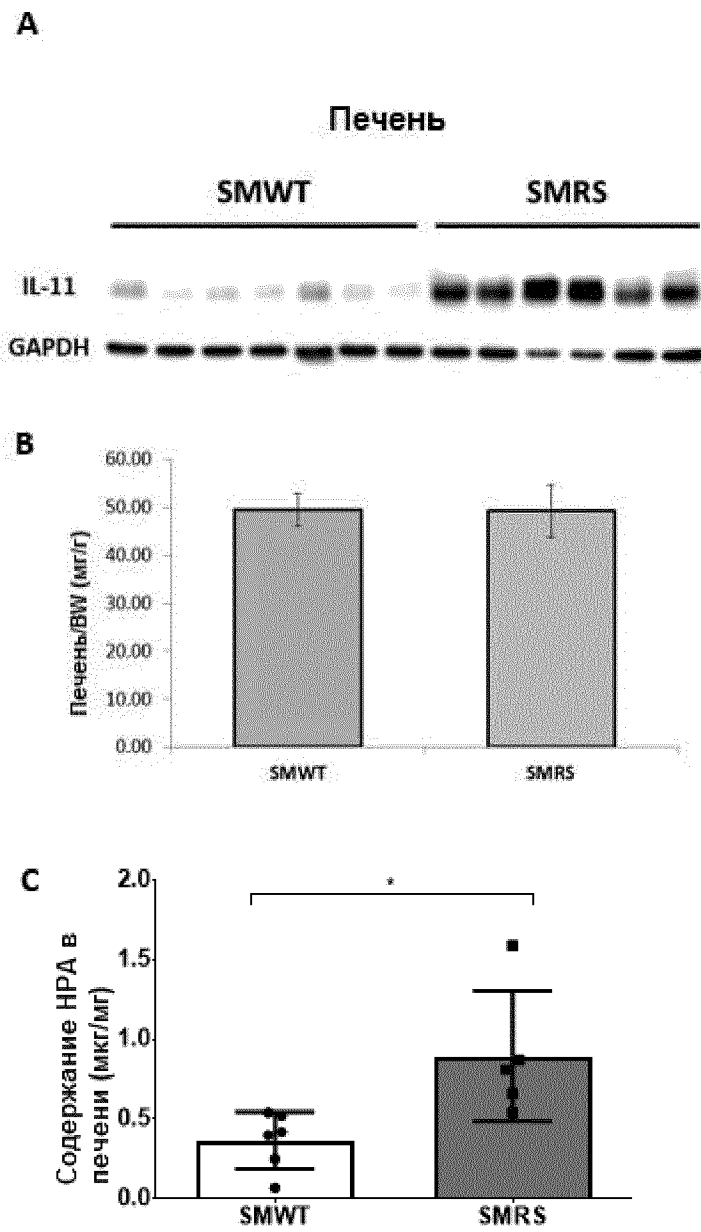


Фиг. 23D

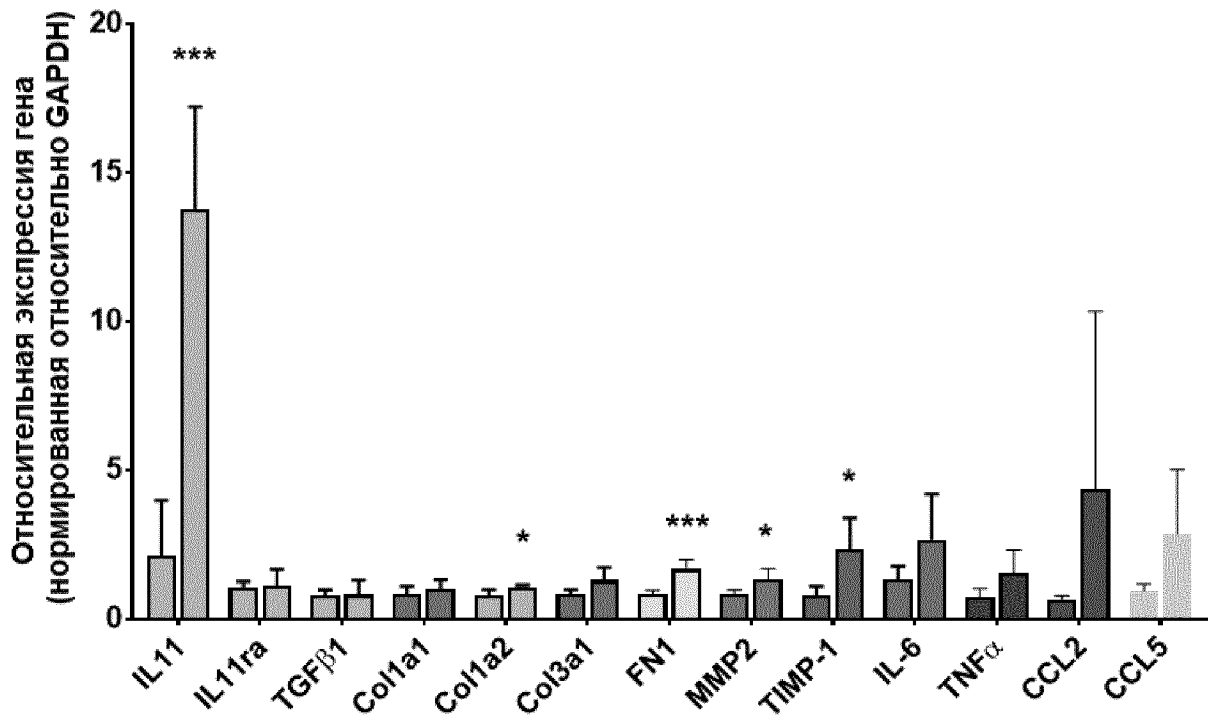


Фиг. 24

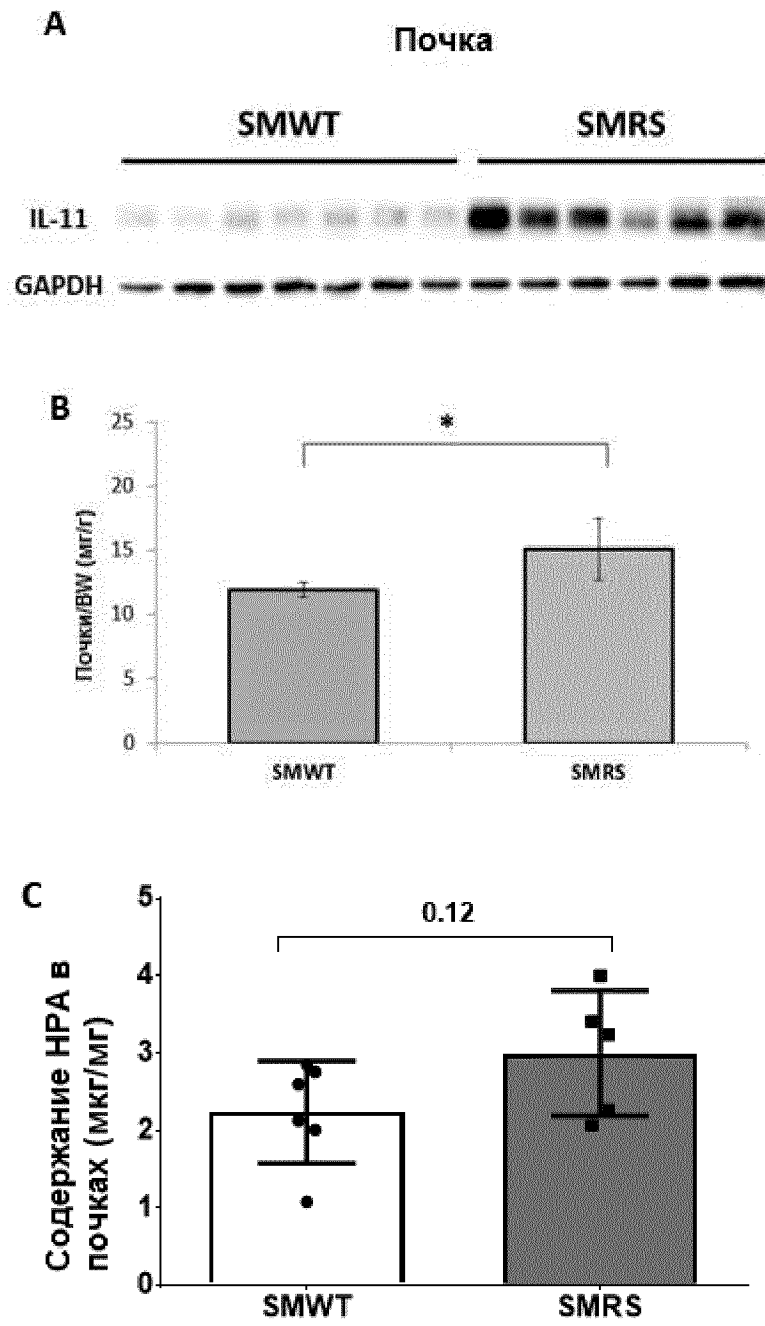




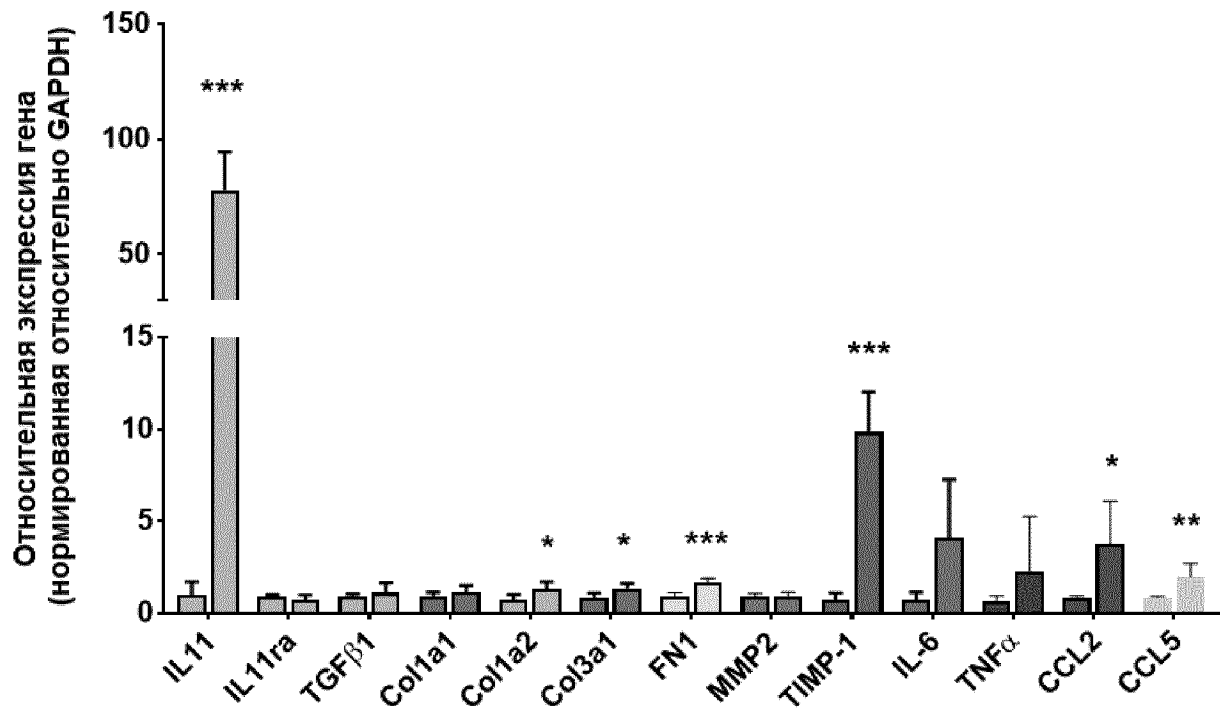
Фиг. 25



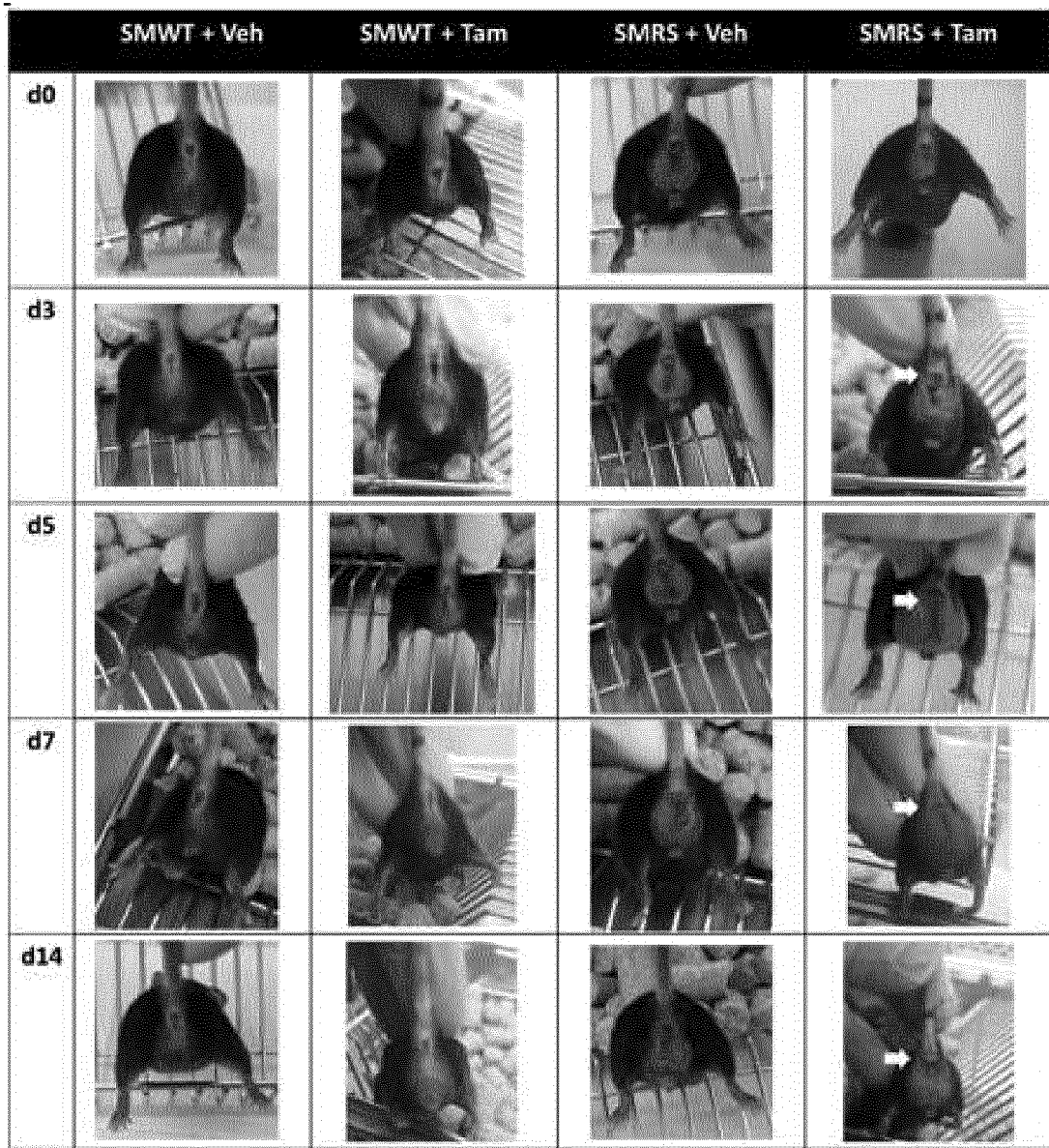
Фиг. 26



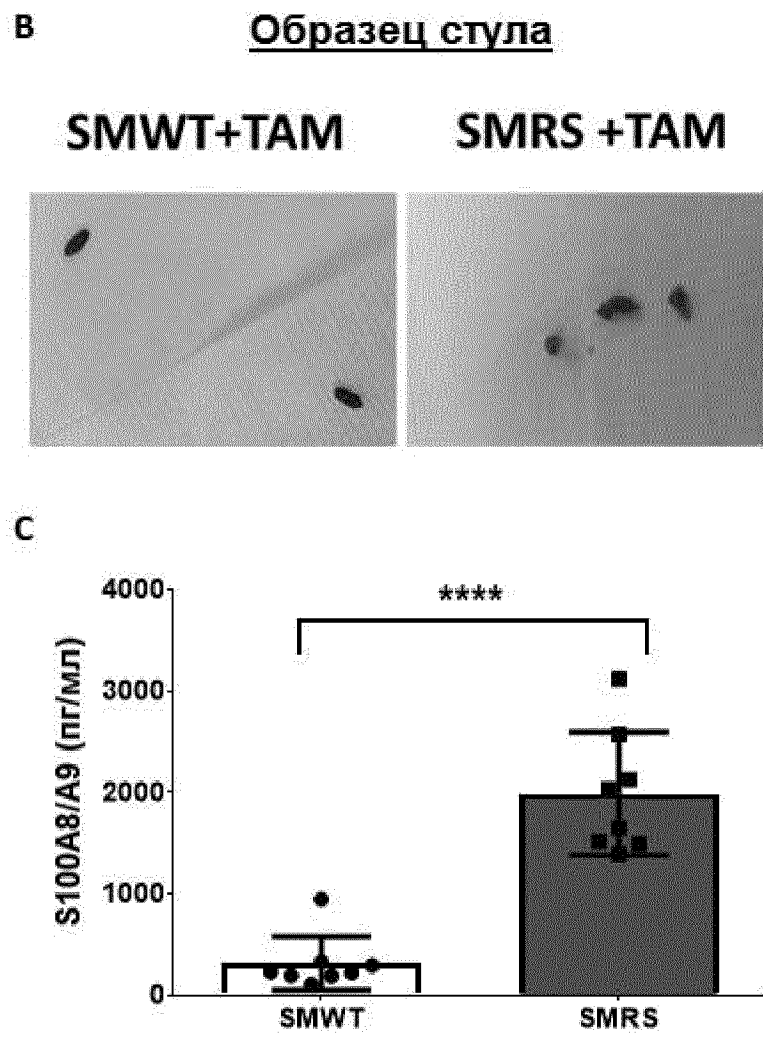
Фиг. 27



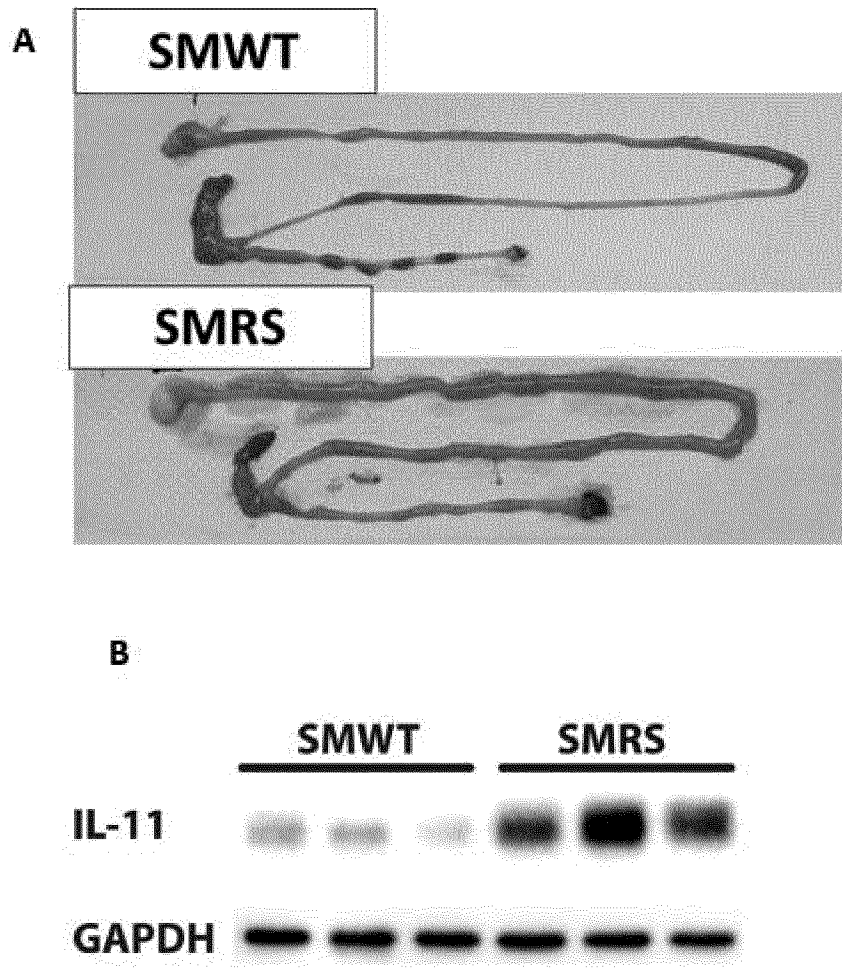
Фиг. 28



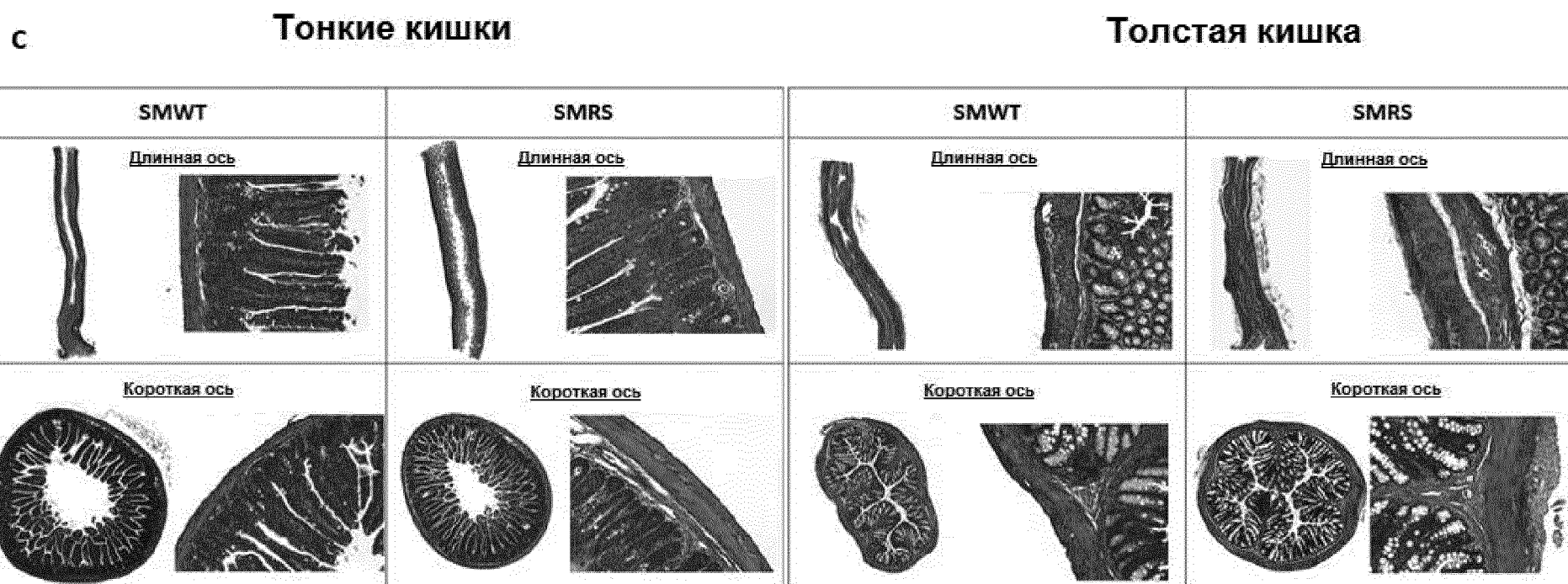
Фиг. 29А



Фиг. 29 (продолжение)

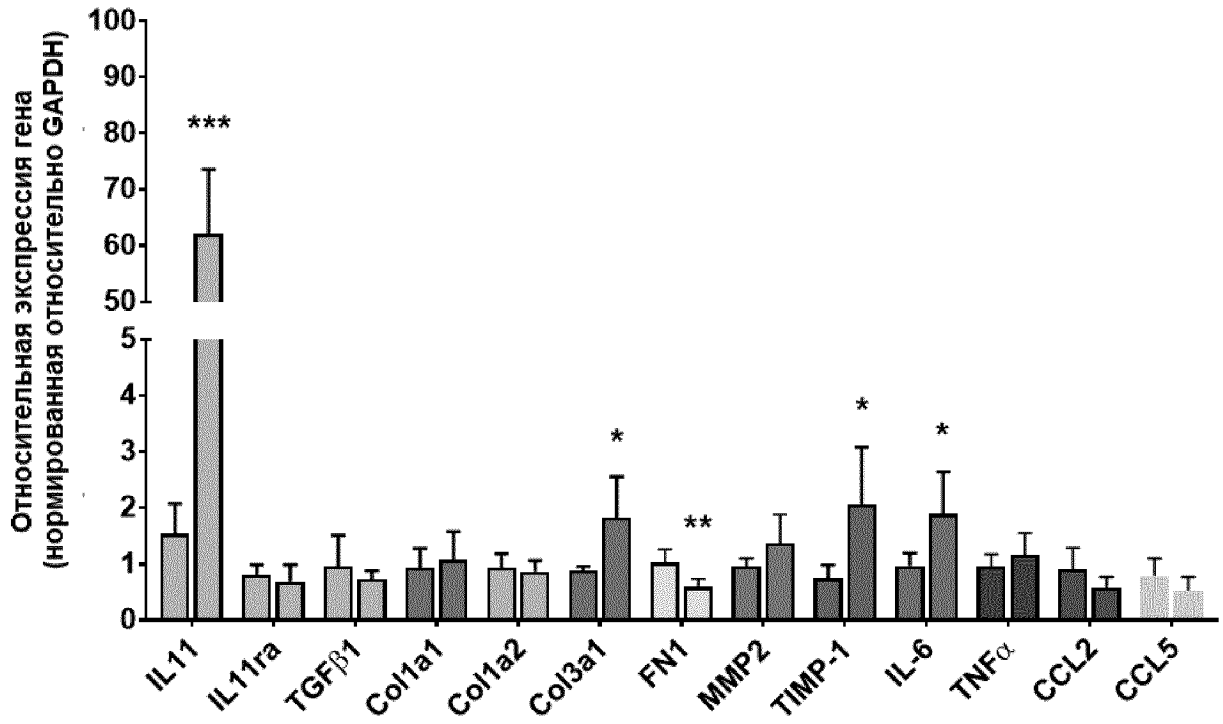


Фиг. 30

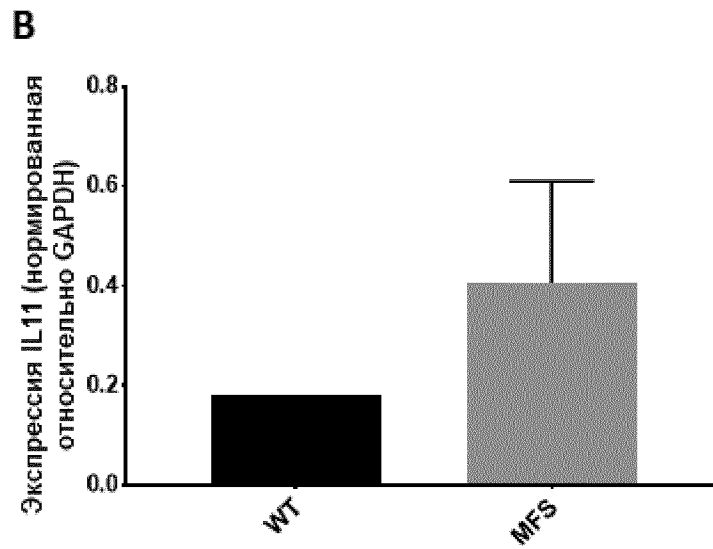
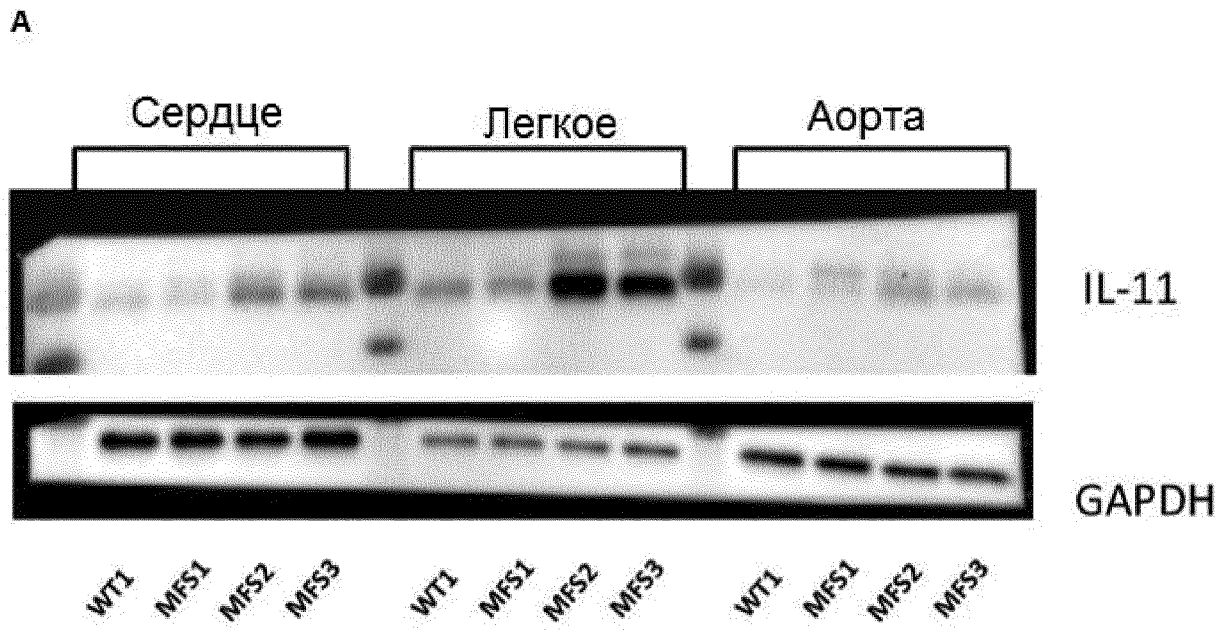


Фигура 30 (продолжение)

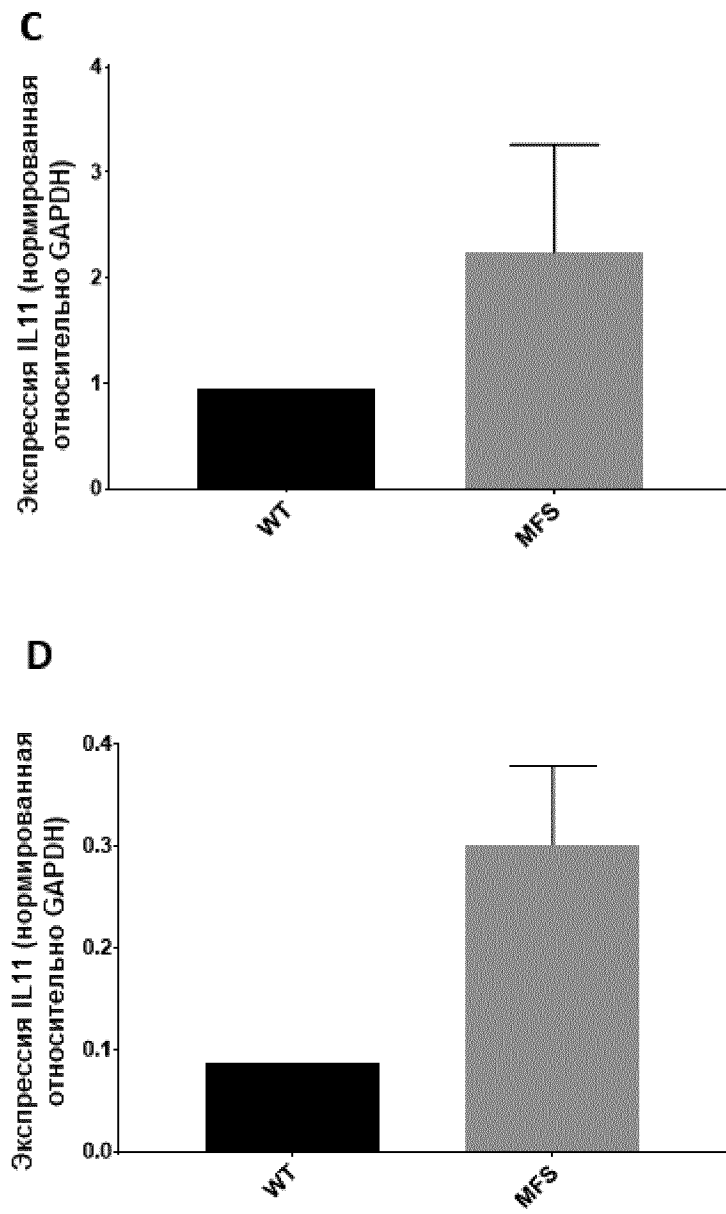




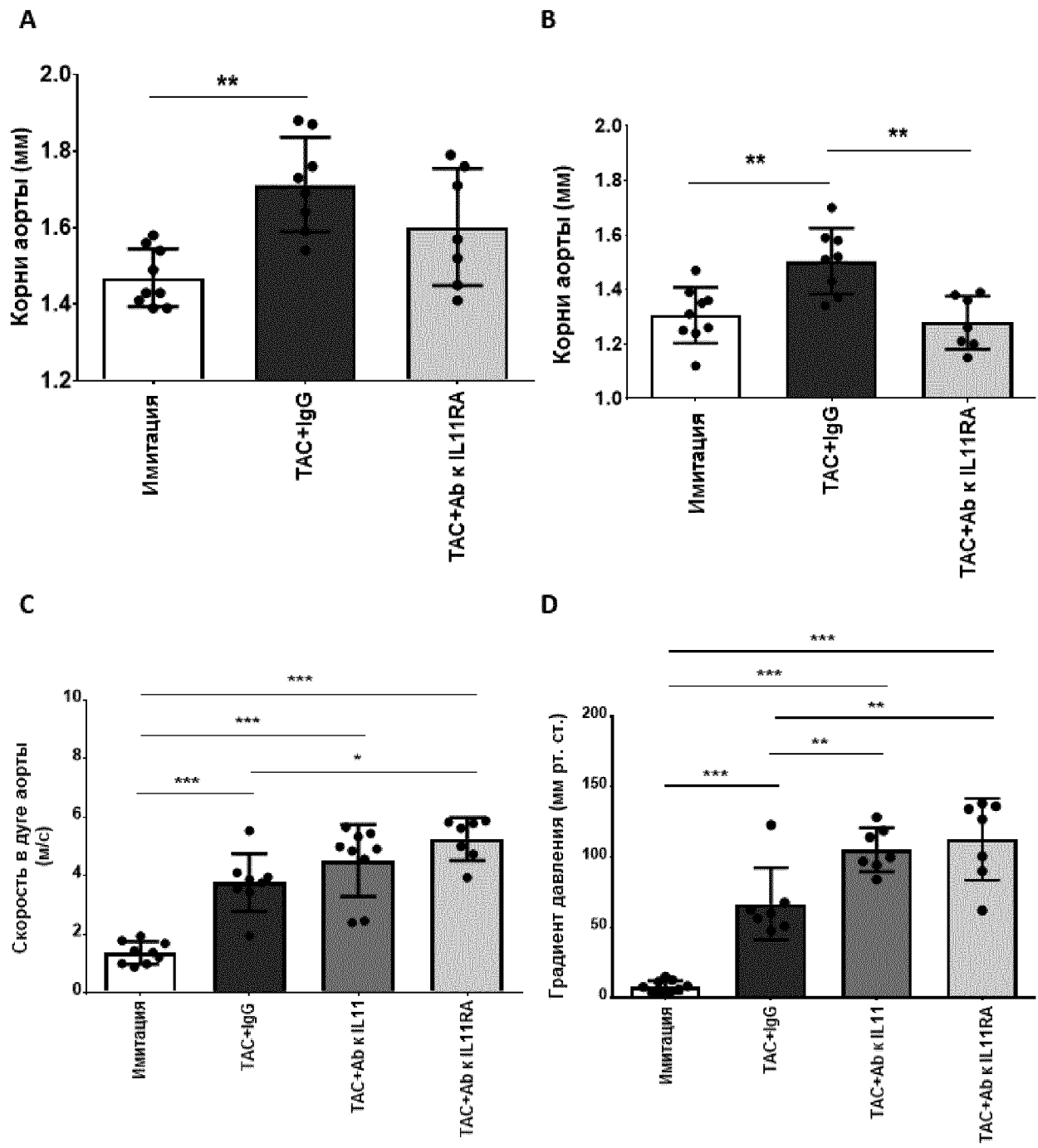
Фиг. 31



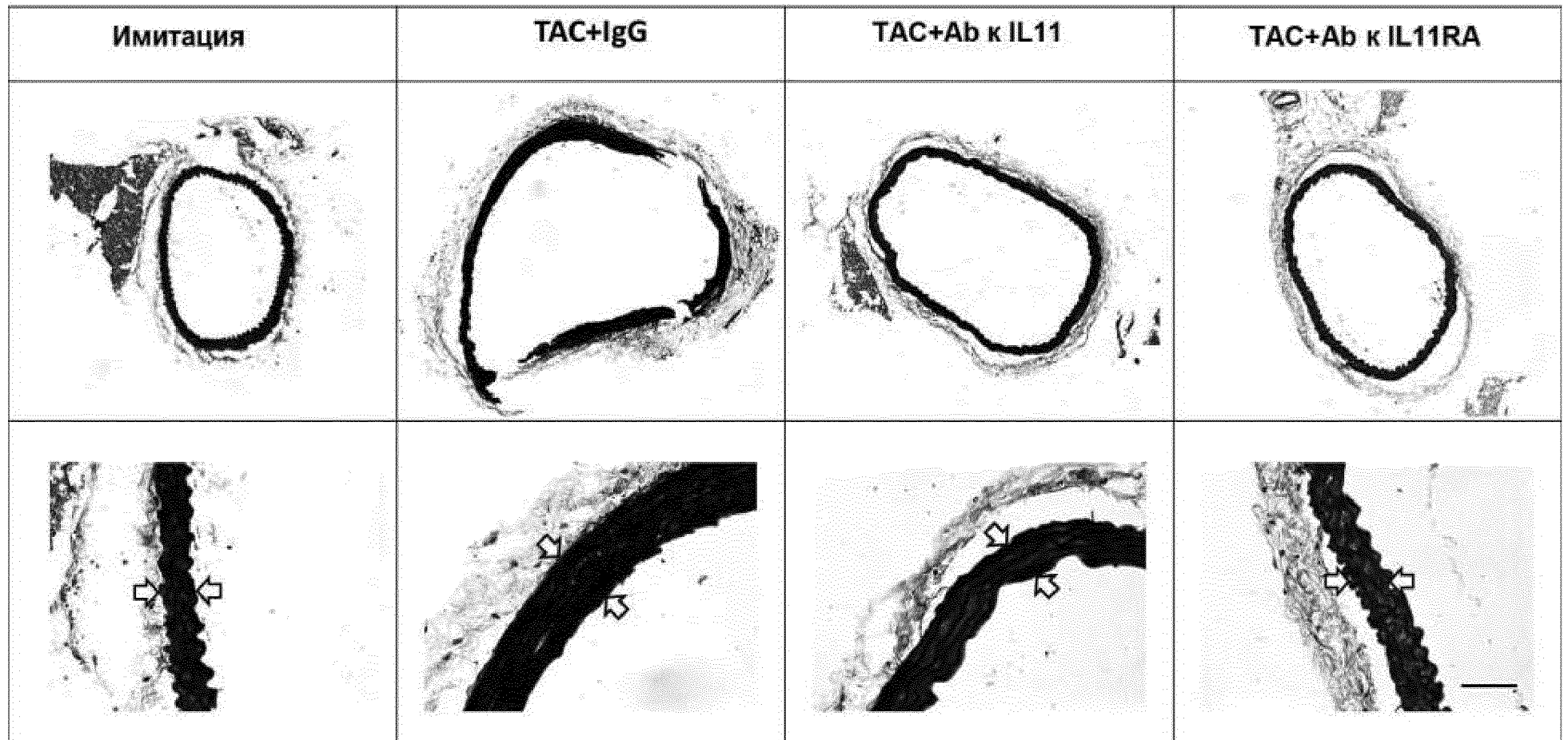
Фиг. 32



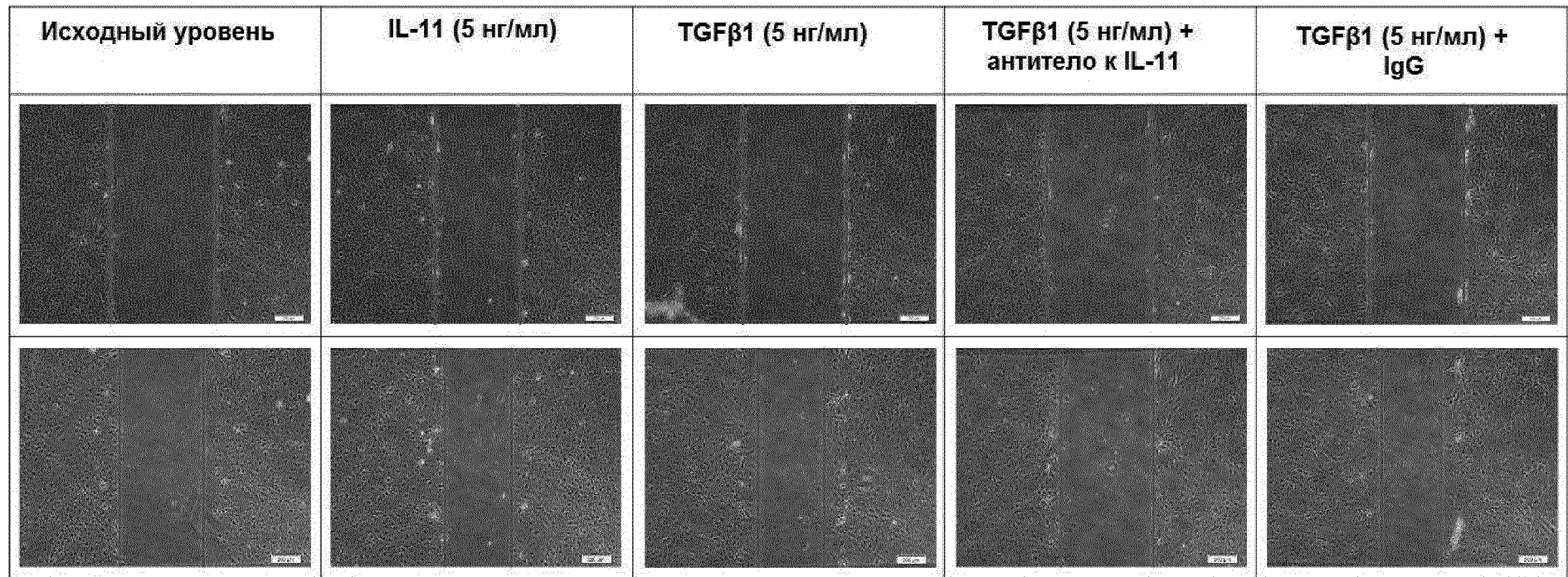
Фиг. 32 (продолжение)



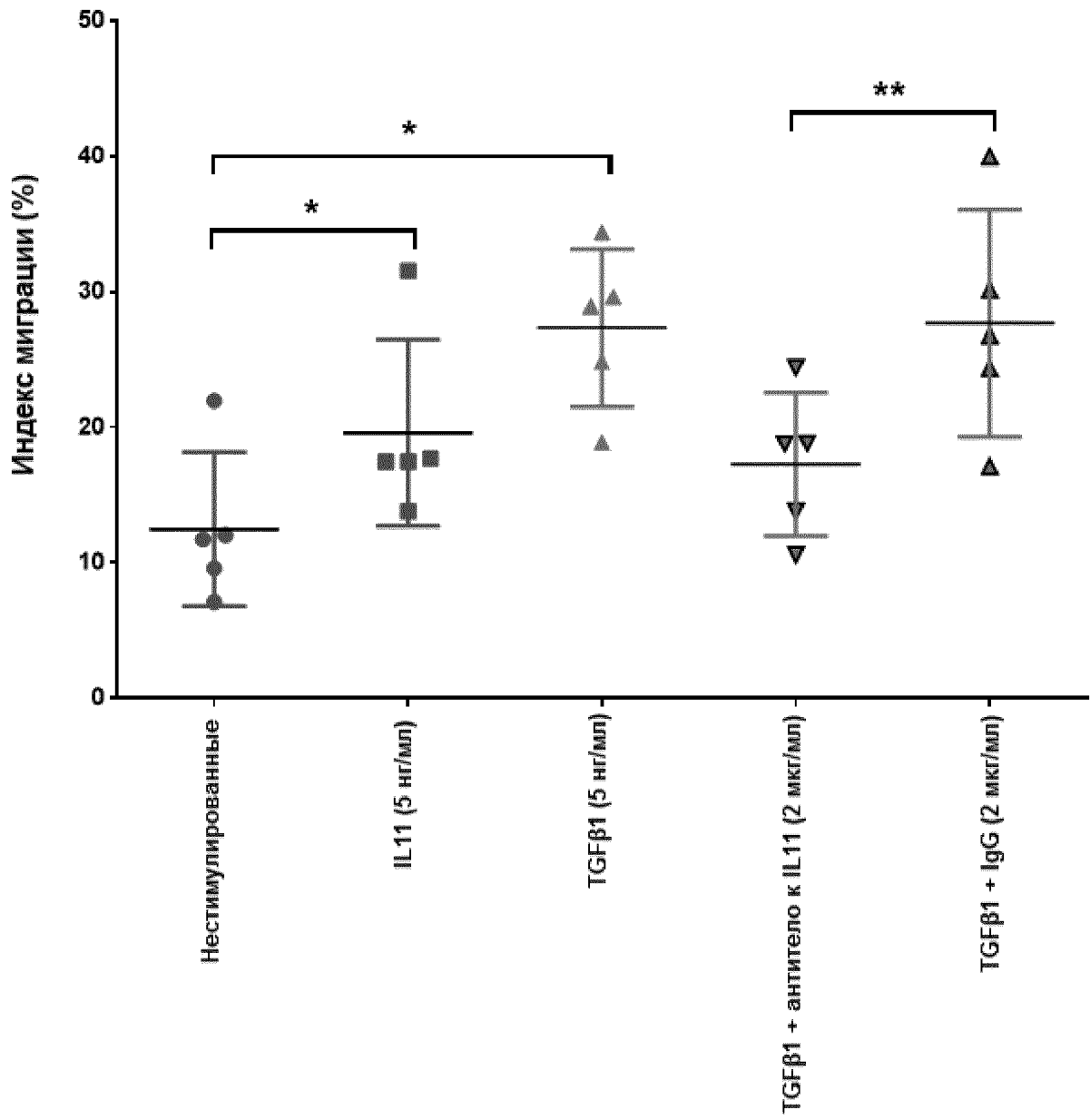
Фиг. 33



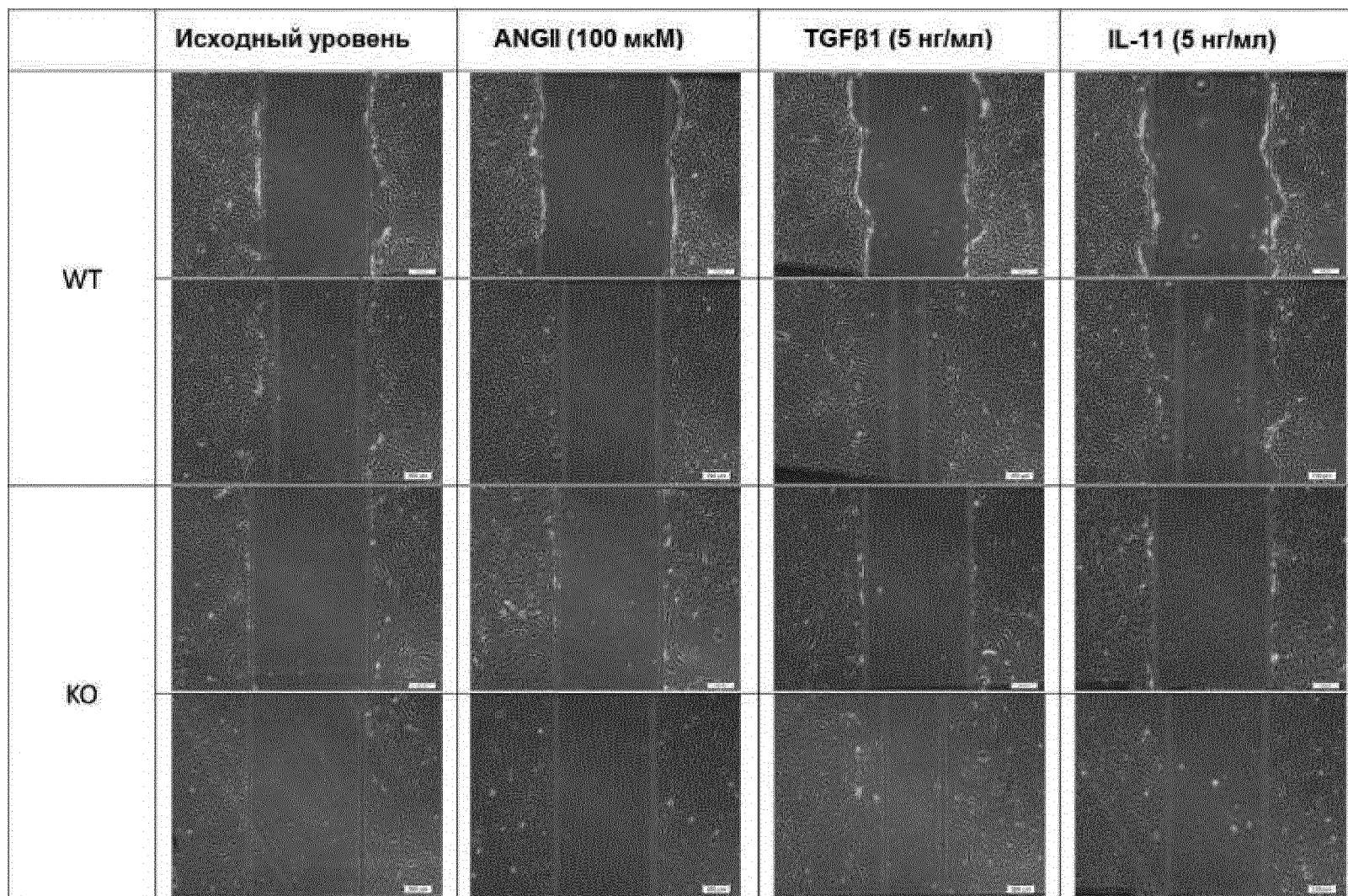
Фиг. 34



Фиг. 35А

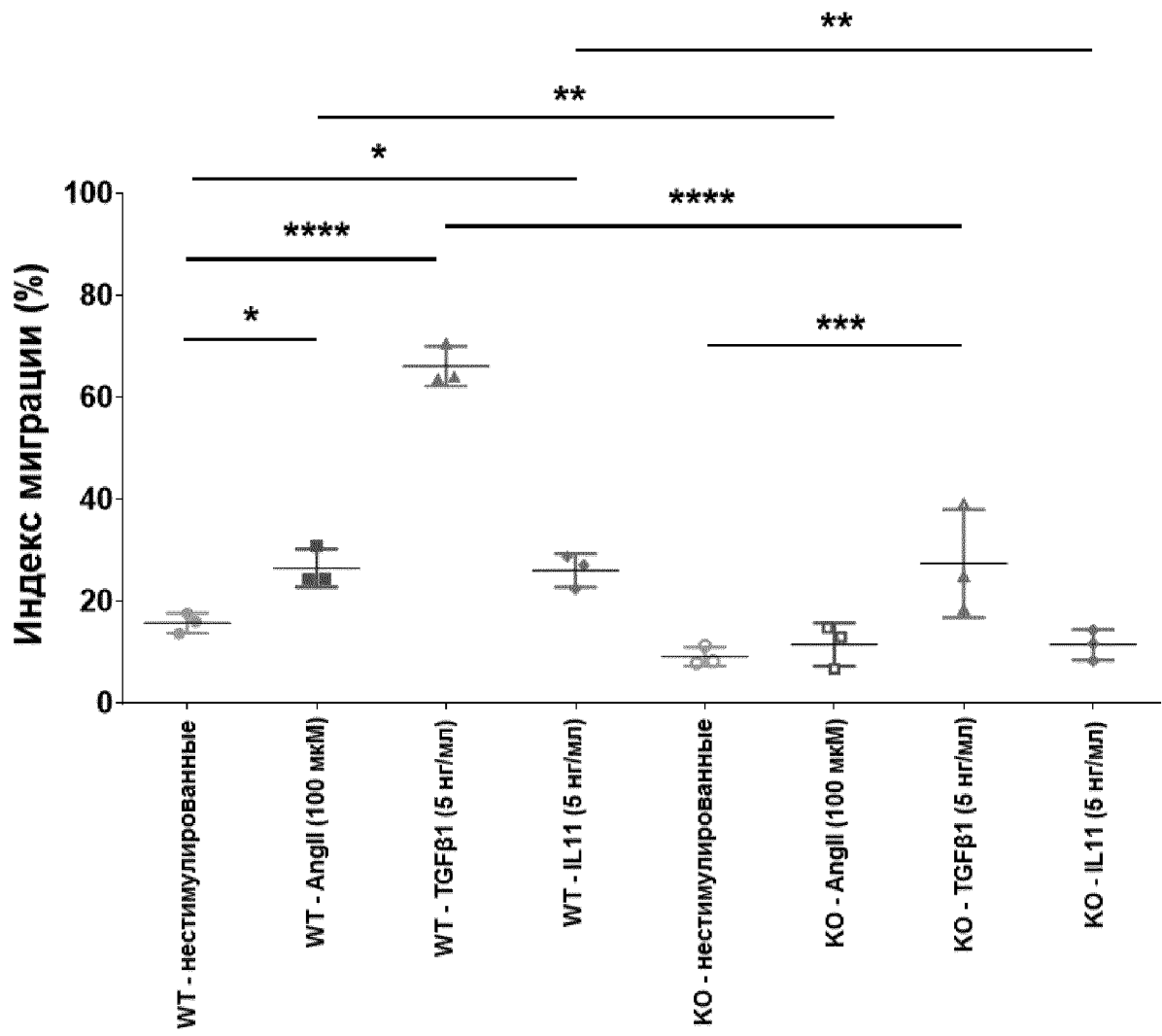


Фиг. 35В



Фиг. 36А





Фиг. 36В