

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291914 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.16

(51) Int. Cl. C07K 14/435 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.01.19

(54) ФАКТОР РОСТА МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКЕ ФИБРОЗА, ГИПЕРТРОФИИ ИЛИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

(31) 20153008.6

(32) 2020.01.21

(33) EP

(86) PCT/EP2021/051079

(87) WO 2021/148411 2021.07.29

(71) Заявитель:
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Воллерт Кай Кристоф, Корф-
Клингебил Мортимер, Реболл
Марк Р., Пекцек Антон (DE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к белку фактора роста миелоидного происхождения (MYDGF) или нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный белок, для применения при лечении или профилактике фиброза и гипертрофии. Настоящее изобретение также относится к белку MYDGF или нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный белок, для применения при лечении сердечной недостаточности. Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту, клеткам-хозяевам, экспрессирующим нуклеиновую кислоту, и способам применения при лечении фиброза и гипертрофии, а также для применения при лечении сердечной недостаточности.

202291914 A1

202291914 A1

ФАКТОР РОСТА МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ
ЛЕЧЕНИИ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКЕ ФИБРОЗА, ГИПЕРТРОФИИ ИЛИ СЕРДЕЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ

5

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к белку фактора роста миелоидного происхождения (MYDGF) или нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный белок, для применения при лечении или профилактике фиброза и гипертрофии. Настоящее
10 изобретение также относится к белку MYDGF или нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный белок, для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности. Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту, клеткам-хозяевам, экспрессирующим нуклеиновую кислоту, и способам применения при лечении фиброза и гипертрофии, а также для
15 применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фактор роста миелоидного происхождения (MYDGF), также известный как фактор 1, представляет собой белок, кодируемый в 10 открытой рамке считывания на
20 19 хромосоме человека (C19Orf10). Этот белок был описан в 2007 году при анализе протеома так называемых фибробластоподобных синовиоцитов (FLS-клеток) как новый секретлируемый фактор в синовии. Несмотря на отсутствие экспериментальных или статистических доказательств, предположили, что существует корреляция между секрецией данного белка и воспалительными заболеваниями сустава (Weiler *et al.*,
25 Arthritis Research and Therapy 2007, The identification and characterization of a new protein, c19orf10, in the synovium). В формуле изобретения соответствующей заявки на патент указан данный белок в качестве терапевтического агента для лечения суставов и для диагностики ткани, подвергающейся изменению роста, а также для мониторинга изменений в ткани (US 2008/0004232 A1, Characterization of c19orf10, a new synovial
30 protein). В еще одной научной публикации описана повышенная экспрессия белка в клетках гепатоцеллюлярной карциномы (Sunagozaka *et al.*, International Journal of Cancer, 2010, Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma). Рекомбинантный продуцируемый белок продемонстрировал усиливающий пролиферацию эффект на культивируемых клетках гепатоцеллюлярной карциномы.

Следует отметить, что C19Orf10 также называют ИЛ-25, ИЛ-27 и ИЛ-27W, поскольку первоначально его считали интерлейкином. Однако термины «ИЛ-25» и «ИЛ-27» используются в данной области техники несогласованно для обозначения множества различных белков. Например, в US 2004/0185049 данный белок называют ИЛ-27 и описывают его применение для модуляции иммунного ответа. Этот белок структурно отличается от фактора 1 (сравните аминокислотную последовательность фактора 1 согласно SEQ ID NO: 1 с аминокислотной последовательностью "ИЛ-27" согласно UniProt: Q8NEV9). Аналогичным образом, в EP 2 130 547 A1 этот белок называют ИЛ-25 и описывают его применение для лечения воспаления. В данной области техники этот белок также называют ИЛ-17E, и он структурно отличается от фактора 1 (сравните аминокислотную последовательность фактора 1 согласно SEQ ID NO: 1 с аминокислотной последовательностью «ИЛ-25» согласно UniProt: Q9H293).

В WO 2014/111458 описан фактор 1 для применения при усилении пролиферации и ингибировании апоптоза нетрансформированной ткани или нетрансформированных клеток, в частности, для применения при лечении острого инфаркта миокарда. Кроме того, описаны ингибиторы фактора 1 для медицинского применения, в частности, для применения при лечении или профилактике заболевания, при котором ангиогенез способствует развитию или прогрессированию заболевания.

Korf-Klingebiel et al. (Nature Medicine, 2015, Vol. 21(2):140-149) сообщают, что C19Orf10 секретируется клетками костного мозга после инфаркта миокарда, причем данный белок способствует выживанию миоцитов сердца и ангиогенезу. Авторы показывают, что моноциты и макрофаги, полученные из костного мозга, эндогенно продуцируют этот белок для защиты и восстановления сердца после инфаркта миокарда, и предлагают название "фактор роста миелоидного происхождения (MYDGF)". В частности, сообщается, что лечение рекомбинантным Mydgm уменьшает размер рубца и сократительную дисфункцию после инфаркта миокарда.

Сердечная недостаточность представляет собой клинический синдром с неблагоприятным прогнозом, который может развиваться в ответ на стойкую гемодинамическую перегрузку, повреждение миокарда или генетические мутации. Хроническое воспаление способствует патогенезу и прогрессированию сердечной недостаточности и стало терапевтической мишенью (Adamo et al. Nat Rev Cardiol. 2020;17:269-285). Связь между сердечной недостаточностью и воспалением является двунаправленной и включает перекрестное взаимодействие между сердцем, иммунной системой и периферическими органами. В миокарде воспалительные цитокины и

факторы роста способствуют сократительной дисфункции и неблагоприятному ремоделированию левого желудочка (ЛЖ), воздействуя на паренхиматозные и стромальные клетки сердца (Bozkurt et al. *Circulation*. 1998;97:1382-1391; Ismahil et al. *Circ Res*. 2014;114:266-282; Sager et al. *Circ Res*. 2016;119:853-864; Hulsmans et al. *J Exp Med*. 2018;215:423-440; Bajpai et al. *Nat Med*. 2018;24:1234-1245).

Острая перегрузка сердца давлением, вызванная операцией по поперечному сужению аорты (ТАС) у мышей, вызывает воспалительную реакцию с участием врожденной и адаптивной иммунной системы (Martini et al. *Тираж*. 2019;140:2089-2107). Сигналы, исходящие от подвергающихся стрессу, но жизнеспособных кардиомиоцитов, запускают воспалительный каскад (Suetomi et al. *Тираж*. 2018;138:2530-2544). В течение нескольких часов увеличиваются уровни экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов в сердце (Baumgarten et al. *Circulation*. 2002;105:2192-2197; Xia et al. *Histochem Cell Biol*. 2009;131:471-481), и в течение недели увеличивается количество и/или проявляются признаки активации иммунных клеток большинства основных субпопуляций в сердце, подвергающемся высокой нагрузке давлением (Xia 2009; Liao et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115:E4661-E4669; Patel et al. *JACC Basic Transl Sci*. 2018;3:230-244).

Фиброз описывает образование избыточной фиброзной соединительной ткани в органе или ткани в ходе репаративного или реактивного процесса, например, реактивного, доброкачественного или патологического состояния. Соединительная ткань, скопившаяся во время фиброза, может нарушать или ингибировать нормальную архитектуру и функцию находящихся под ней органа или ткани.

Гипертрофия описывает увеличение объема органа или ткани за счет увеличения составляющих их клеток.

Сохраняется потребность в средствах и способах лечения гипертрофии и фиброза. Также сохраняется потребность в средствах и способах лечения сердечной недостаточности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к фактору роста миелоидного происхождения (MYDGF), или его фрагменту или варианту, демонстрирующему биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

Согласно одному варианту реализации белок MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, предназначен для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности. Согласно предпочтительному варианту реализации, сердечная недостаточность представляет собой хроническую сердечную недостаточность. Согласно другому варианту реализации, сердечная недостаточность или хроническая сердечная недостаточность представляют собой сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечную недостаточность с уменьшенной фракцией выброса (HFmrEF) или сердечную недостаточность с фракцией выброса в среднем диапазоне (HFmEF).

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации белок MYDGF содержит SEQ ID NO: 1. В качестве альтернативы, белок MYDGF содержит фрагмент или вариант SEQ ID NO: 1, проявляющий биологическую функцию MYDGF, причем указанный вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1.

Согласно предпочтительному варианту реализации, фиброз представляет собой фиброз сердца, почки, легкого и/или печени. Согласно одному варианту реализации, указанный фиброз представляет собой интерстициальное заболевание легких, предпочтительно прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких и более предпочтительно - идиопатический легочный фиброз.

Согласно предпочтительному варианту реализации, гипертрофия представляет собой гипертрофию кардиомиоцитов.

Согласно дополнительному аспекту, в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая белок фактора роста MYDGF, или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

Согласно дополнительному аспекту, в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая белок фактора роста MYDGF, или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении сердечной недостаточности.

Согласно одному варианту реализации, указанная нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

Согласно дополнительному аспекту, в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

5 Согласно еще одному аспекту, в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, для применения при лечении сердечной недостаточности.

Согласно дополнительному аспекту, в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению или вектор согласно настоящему изобретению, для применения при лечении или
10 профилактике фиброза или гипертрофии. Клетка-хозяин предпочтительно экспрессирует указанную нуклеиновую кислоту.

Согласно еще одному аспекту, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок MYDGF, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяин согласно настоящему изобретению и, необязательно,
15 подходящее фармацевтическое вспомогательное вещество, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

Согласно еще одному аспекту, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок MYDGF, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяин согласно настоящему изобретению и, необязательно,
20 подходящее фармацевтическое вспомогательное вещество, для применения при улучшении функции сердца.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения, фармацевтическую композицию для применения вводят перорально, внутривенно, подкожно, интрамукозально, внутриартериально, внутримышечно или
25 внутрикоронарно. Введение предпочтительно осуществляют посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний.

В соответствии с дополнительным аспектом, в настоящем изобретении предложен способ лечения фиброза. Способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества MYDGF или его
30 фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF.

Согласно одному варианту реализации MYDGF содержит SEQ ID NO: 1 или фрагмент или вариант SEQ ID NO: 1 и проявляет биологическую функцию MYDGF. Указанный вариант содержит аминокислотную последовательность,

характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации, фиброз представляет собой фиброз сердца, почки, легкого и/или печени.

5 Согласно еще одному варианту реализации, MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

10 В соответствии с дополнительным аспектом, в настоящем изобретении предложен способ лечения гипертрофии. Способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества MYDGF или его фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF.

Согласно одному варианту реализации MYDGF содержит SEQ ID NO: 1 или фрагмент или вариант SEQ ID NO: 1 и проявляет биологическую функцию MYDGF.

15 Указанный вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

Согласно предпочтительному варианту реализации, гипертрофия представляет собой гипертрофию кардиомиоцитов.

20 Согласно еще одному варианту реализации, MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

25 В соответствии с дополнительным аспектом, в настоящем изобретении предложен способ лечения или профилактики сердечной недостаточности, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фактора роста MYDGF или его фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF. Согласно предпочтительному варианту реализации, сердечная недостаточность представляет собой хроническую сердечную недостаточность. Согласно другому предпочтительному варианту реализации, 30 сердечная недостаточность или хроническая сердечная недостаточность представляет собой HFpEF или HFrEF, причем HFpEF предпочтительно представляет собой HFpEF стадии C или стадии D, или HFrEF представляет собой HFrEF стадии C или стадии D.

Согласно одному варианту реализации, MYDGF содержит SEQ ID NO: 1 или фрагмент или вариант SEQ ID NO: 1 и проявляет биологическую функцию MYDGF. Указанный вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

Согласно еще одному варианту реализации, MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Фактор роста миелоидного происхождения ингибирует фосфорилирование SMAD, стимулируемое трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) в фибробластах легких у пациента с идиопатическим легочным фиброзом. Фосфорилирование SMAD2 (Ser465/467) и SMAD3 (Ser423/425) (нормированное по экспрессии α -тубулина) в фибробластах легких пациента с идиопатическим легочным фиброзом, культивируемых в отсутствие или в присутствии TGF $\beta 1$ и/или MYDGF.

Фигура 2: Фактор роста миелоидного происхождения ингибирует фосфорилирование SMAD, стимулируемое трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) в фибробластах левого желудочка у пациента с терминальной сердечной недостаточностью. Фосфорилирование SMAD2 (Ser465/467) и SMAD3 (Ser423/425) (нормированное по экспрессии нефосфорилированного SMAD2/3) в фибробластах левого желудочка пациента с терминальной сердечной недостаточностью, культивированных в отсутствие или в присутствии TGF $\beta 1$ и/или MydGF.

Фигура 3: Фактор роста миелоидного происхождения ингибирует фосфорилирование SMAD, стимулируемое трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) в фибробластах левого желудочка у пациента с терминальной сердечной недостаточностью. Фосфорилирование SMAD2 (Ser465/467) и SMAD3 (Ser423/425) (нормированное по экспрессии нефосфорилированного SMAD2/3) в фибробластах левого желудочка пациента с терминальной сердечной недостаточностью, культивированных в отсутствие или в присутствии TGF $\beta 1$ и/или MYDGF.

Фигура 4: Фактор роста миелоидного происхождения мышцы ингибирует фосфорилирование Smad, стимулируемое трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (Tgf $\beta 1$) в эмбриональных фибробластах мышцы.

Фигура 5: MYDGF ослабляет ремоделирование левого желудочка (LV) во время перегрузки давлением. (A) Мышей с *Mydgf* дикого типа (ДТ) и мышей с нокаутом *Mydgf* (КО) подвергали поперечному сужению аорты (ТАС) или имитационной операции (7 день). Отношение массы ЛЖ к длине большеберцовой кости. Типичные продольные срезы ткани (7 день, шкала 1 мм) и сводные данные от 6–15 мышей на группу. *** $P < 0,001$ по сравнению с животными того же генотипа с имитационной операцией (однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта); # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ (t-критерии для 2 независимых выборок). (B) площадь поперечного сечения кардиомиоцитов ЛЖ. Типичные срезы ткани, окрашенные агглютинином зародышей пшеницы (WGA; шкала 50 мкм) и сводные данные от 3–7 мышей на группу. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ по сравнению с животными того же генотипа с имитационной операцией (однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта); # $P < 0,05$, ## $P < 0,001$ (t-критерии для 2 независимых выборок). (C) Размер выделенных кардиомиоцитов желудочков. Типичные изображения, полученные с помощью фазово-контрастной микроскопии (7 день; шкала 100 мкм), и сводные данные от 3–8 мышей на группу. *** $P < 0,001$ по сравнению с животными того же генотипа с имитационной операцией (статистический критерий); # $P < 0,05$ (статистический критерий). (D) Типичные петли "давление-объем ЛЖ" через 7 суток после имитационной операции или операции ТАС.

Фигура 6: MYDGF, полученный из костного мозга, ослабляет ремоделирование левого желудочка (ЛЖ). (A–E) Клетки костного мозга (BMC) мышей с *Mydgf* дикого типа (ДТ) или с нокаутом *Mydgf* (КО) трансплантировали реципиентам (→) КО или ДТ. После восстановления костного мозга мышам выполняли операцию по поперечному сужению аорты (ТАС), и за ними наблюдали в течение 14 суток. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (t-критерии для 2 независимых выборок). (A) Отношение массы ЛЖ к длине большеберцовой кости. 7–18 мышей на группу. (B) площадь поперечного сечения кардиомиоцитов ЛЖ. 4–5 мышей на группу. (C) Плотность изолектин B4 (IB4)⁺-эндотелиальных клеток. 4–6 мышей на группу. (D) Конечно-диастолическая площадь левого желудочка (LVEDA) и конечно-систолическая площадь левого желудочка (LVESA), определенная с помощью эхокардиографии. 5–10 мышей на группу. LVEDA: $P < 0,05$, ДТ→КО по сравнению с КО→КО. LVESA: $P < 0,01$, ДТ→КО по сравнению с КО→КО (t-критерии для 2 независимых выборок). (E) Фракционное изменение площади (FAC). Те же животные, что и для графика (D). Круги представляют собой отдельных мышей. Горизонтальные

линии представляют собой средние значения. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. (F) Экспериментальная стратегия, используемая в (G–N) для сверхэкспрессии MYDGF в воспалительных клетках путем лентивирусного переноса генов (HSC означает гемопоэтическую стволовую клетку). (G) Типичные иммуноблоты (для четырех животных), демонстрирующие экспрессию MYDGF и альфа-тубулина в BMC и спленocyтaх у мышей-реципиентов ДТ через 6 недель после трансплантации клеток BMC, трансдуцированных лентивирусом, с последующим применением доксициклина или без лечения в течение 1 недели. (H) Уровни MYDGF в плазме мышей-реципиентов ДТ через 6 недель после трансплантации клеток BMC, трансдуцированных лентивирусом, с последующим применением доксициклина или без лечения в течение 1 недели. (I–M) Все животные получали доксициклин. (I) Типичные иммуноблоты, демонстрирующие экспрессию MYDGF и GAPDH в ЛЖ мышей-реципиентов ДТ через 6 недель после трансплантации клеток BMC, трансдуцированных лентивирусом, с последующим применением доксициклина или без лечения в течение 1 недели. (J–L и N) * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ по сравнению с аналогичными животными с имитационной операцией и трансдукцией лентивирусом; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ (2-сторонний ANOVA с апостериорным критерием Тьюки). (J) Отношение массы ЛЖ к длине большеберцовой кости. 6 мышей на группу. (K) Площадь поперечного сечения кардиомиоцитов ЛЖ. 5 мышей на группу. (L) Плотность IB4⁺-эндотелиальных клеток. 6–7 мышей на группу. (M) LVEDA и LVESA. 6–8 мышей на группу. LVEDA и LVESA: $P < 0,001$, контрольный лентивирус, TAC по сравнению с контрольным лентивирусом, имитационная операция. LVEDA: $P < 0,05$, TAC, перенос MYDGF с помощью лентивируса по сравнению с TAC, контрольный лентивирус. LVESA: $P < 0,01$, TAC, перенос MYDGF с помощью лентивируса по сравнению с TAC, контрольный лентивирус. (N) FAC. Те же животные, что и для графика (M).

Фигура 7: Гипертрофия кардиомиоцитов. Кардиомиоциты желудочка новорожденной крысы стимулировали в течение 24 часов эндотелином 1 (ET1, 100 нмоль/л), ангиотензином II (Ang II, 100 нмоль/л), инсулиноподобным фактором роста (ИФР, 50 нг/мл) и/или MYDGF (100 нг/мл, если не указано иное). (A) Типичные изображения, полученные при иммунофлуоресцентной микроскопии. Шкала 50 мкм. Сводные данные 4–6 экспериментов. (B) Кривая «доза-ответ». Данные 4 экспериментов. Полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC₅₀) рассчитывали по 4-параметрической логистической регрессии. Контроль обозначает размер

нестимулированных клеток. (С) Содержание белка. Данные 3 экспериментов. (D) Уровни экспрессии *Muh7* (тяжелой цепи бета-миозина), *Nppa* (натрийуретического пептида типа А) и мРНК *Gapdh*, определенные с помощью ОТ-кПЦР. Данные 7-13 экспериментов. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ по сравнению с нестимулированным контролем; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ (однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

Фигура 8: Анализ фосфопротеома выявил, что PIM1 является мишенью MYDGF в сигнальном пути. (A–D) Анализ фосфопротеома кардиомиоцитов желудочков новорожденной крысы (NRCM), стимулированных в течение 8 часов эндотелином 1 (ET1, 100 нмоль/л) и/или MYDGF (100 нг/мл). (A) Блок-схема, на которой показан восходящий подход к определению активности киназ на основе фосфопротеомных данных и предварительной информации о взаимодействиях киназа-субстрат. (B) Анализ главных компонентов наборов фосфопротеомных данных (4 биологических повторности на каждое условие). (C) Гистограмма, на которой показаны изменения фосфопротеома. Красные столбики представляют все сайты фосфорилирования, значимо регулируемые ET1 по сравнению с нестимулированным контролем ($n=120$, $P < 0,05$, $\log_2$ -кратное изменение более 1). Синие столбики изображают регуляцию этих сайтов в клетках, стимулированных ET1 плюс MYDGF по сравнению с клетками, стимулированными только ET1. (D) Получение информации об активности киназ на основе субстрата в клетках, стимулированных ET1 плюс MYDGF по сравнению с клетками, стимулированными только ET1. (E) Экспрессия белка PIM1 и активность киназ (F) в NRCM, стимулированных в течение 16 часов ET1 и/или MYDGF. 6 экспериментов. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (t -критерии для 2 независимых выборок). (G) Размер NRCM после стимуляции ET1, MYDGF и/или SMI4a (10 мкмоль/л) в течение 24 часов. 3 эксперимента. * $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # $P < 0,05$ (однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Тьюки). (H) Размер NRCM после трансфекции малой интерферирующей (ми)РНК PIM1 или миРНК, содержащей те же нуклеотиды в другой последовательности (scrambled, SCR), и стимуляции ET1 и/или MYDGF в течение 24 часов. На типичных иммуноблотах показана экспрессия PIM1 и бета-актина после трансфекции миРНК. 4 эксперимента. *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем, ## $P < 0,01$ (однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

Фигура 9: MYDGF усиливает экспрессию SERCA2a за счет PIM1. (A) Типичные иммуноблоты и сводные данные, демонстрирующие экспрессию PIM1,

Ca²⁺ АТФазы 2а сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA2а) и бета-актина в кардиомиоцитах желудочка новорожденной крысы (NRCM), стимулированных MYDGF (100 нг/мл). 4–5 экспериментов. *P<0,05 по сравнению с исходным уровнем (однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта). (B) Типичные иммуноблоты (из трех), демонстрирующие экспрессию SERCA2а и бета-актина в NRCM, стимулированных MYDGF и/или SMI4а (10 мкмоль/л) в течение 16 часов. Там, где это указано, клетки сначала трансфицировали малой интерферирующей (ми)РНК PIM1 или миРНК, содержащей те же нуклеотиды в другой последовательности (scrambled, SCR). (C) Типичные иммуноблоты и сводные данные, демонстрирующие экспрессию SERCA2а и винкулина в левом желудочке (LV) мышей с *Mydgf* дикого типа (ДТ) и мышей с нокаутом (КО) *Mydgf*, подвергшихся имитационной операции или операции по поперечному сужению аорты (ТАС). 9 мышей на группу. ***P<0,001 по сравнению с животными того же генотипа с имитационной операцией (однофакторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта); #P<0,05 (t-критерий по 2 независимым выборкам). (D) Типичные иммуноблоты и сводные данные, демонстрирующие экспрессию SERCA2а, PIM1 и альфа-тубулина в кардиомиоцитах, выделенных из организмов мышей ДТ и мышей с КО через 7 суток после имитационной операции или ТАС. 5–6 мышей на группу. *P<0,05, **P<0,001 по сравнению с животными того же генотипа с имитационной операцией; #P<0,05, #P<0,01 (двухфакторный ANOVA с апостериорным критерием Тьюки). (E) Клетки костного мозга мышей ДТ или мышей с КО трансплантировали (→) реципиентам с КО или реципиентам ДТ, подвергшимся летальному облучению. После восстановления костного мозга мышам выполняли операцию ТАС, и за ними наблюдали в течение 14 суток. Типичные иммуноблоты и сводные данные, демонстрирующие экспрессию SERCA2а, PIM1 и альфа-тубулина в ЛЖ. 8 мышей на группу. *P<0,05 (t-критерии для 2 независимых выборок). (F) Типичные иммуноблоты и сводные данные, демонстрирующие экспрессию SERCA2а, PIM1 и бета-актина в ЛЖ через 7 суток после ТАС. Мышам трансплантировали клетки костного мозга, трансдуцированные контрольным лентивирусом или лентивирусом с MYDGF, и вводили доксициклин, начиная за 1 неделю до операции. ***P<0,001 (t-критерии для 2 независимых выборок).

Фигура 10: Терапия белком MYDGF. (A) Схема лечения. После операции по поперечному сужению аорты (ТАС) мышам вводили внутривентрикулярную (ЛЖ) болюсную инъекцию рекомбинантного MYDGF (10 мкг) с последующим подкожным

вливанием в течение 3 (B), 7 (C) или 42 (D–I) суток (10 мкг/сут). Контрольные мыши после операции ТАС получали только разбавитель (болюсная инъекция и вливание).

(B) Уровни MYDGF в плазме. 5–7 мышей на группу. *** $P < 0,001$ (критерий). (C) Типичные иммуноблоты и сводные данные, демонстрирующие экспрессию

5 Ca^{2+} -АТФазы 2а сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA2a) и альфа-тубулина в ЛЖ. 5–7 мышей на группу. * $P < 0,05$ (t -критерии для 2 независимых выборок). (D) Конечно-диастолическая площадь левого желудочка (LVEDA) и конечно-систолическая площадь левого желудочка (LVESA), определенная с помощью последовательной эхокардиографии через 7 и 42 суток после ТАС (16–22

10 мыши на группу) или через 7 суток после имитационной операции (9 мышей). LVEDA: $P < 0,01$, ТАС (контроль и MYDGF) по сравнению с имитационной операцией через 28 суток. LVESA: $P < 0,01$, ТАС (контроль и MYDGF) по сравнению с имитационной операцией через 7 и 28 суток (однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннетта). LVEDA: $P < 0,01$, MYDGF по сравнению с

15 контролем через 28 суток; LVESA: $P < 0,001$, MYDGF по сравнению с контролем через 28 суток (t -критерии для 2 независимых выборок). (E) Фракционное изменение площади (FAC). Те же животные, что и для графика (C). *** $P < 0,001$ по сравнению со всеми группами ТАС (однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннетта); ## $P < 0,01$, # $P < 0,001$ КО по сравнению с ДТ (t -критерии для 2 независимых выборок).

20 (F) Отношение массы ЛЖ к длине большеберцовой кости через 28 суток. 6–12 мышей на группу. (G) Площадь поперечного сечения кардиомиоцитов ЛЖ через 28 суток. 6 мышей на группу. (C) Плотность изолектин В4 (IB4)⁺-эндотелиальных клеток в левом желудочке через 28 суток. 6 мышей на группу. (E–G) * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ по сравнению с имитационной операцией (однофакторный ANOVA с апостериорным

25 критерием Даннетта); # $P < 0,05$, ## $P < 0,001$ (t -критерии для 2 независимых выборок). (I) Совокупная выживаемость после ТАС у 27 контрольных мышей и 17 мышей, получавших MYDGF. * $P = 0,05$ (логарифмический ранговый критерий).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 Перед приведением подробного описания настоящего изобретения ниже следует отметить, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящем документе, поскольку все указанные параметры могут меняться. Также следует понимать, что терминология,

используемая в настоящей заявке, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не призвана ограничить сущность настоящего изобретения, которая ограничивается исключительно прилагаемой формулой изобретения. Если не указано обратное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значение, общепринятое среди обычных специалистов в данной области техники.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термины, используемые в настоящем документе, предпочтительно имеют определения, описанные в источнике "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

Для реализации настоящего изобретения, если не указано иное, применяют обычные способы, используемые в области химии, биохимии, клеточной биологии и технологии рекомбинантных ДНК, объяснение которых приведено в литературе, посвященной данной области техники (см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989). Кроме того, применяют традиционные способы, используемые в клинической кардиологии, объяснение которых также приведено в литературе, посвященной данной области техники (см., например, *Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 9th Edition, P. Libby et al. eds., Saunders Elsevier Philadelphia, 2011).

Во всем описании и следующей за ним формуле изобретения, если контекст не диктует обратное, слово «содержать» и их варианты, например, «содержит» и «содержащий» следует понимать как включение указанного целого числа или этапа либо группы целых чисел или этапов, но не исключение каких-либо других целых чисел или этапов либо группы целых чисел или этапов. В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекст однозначно не диктует обратное.

Под молекулами нуклеиновой кислоты понимают полимерные макромолекулы, составленные из мономеров-нуклеотидов. Мономеры-нуклеотиды состоят из нуклеинового основания, углевода, содержащего пять атомов углерода (например, рибозы или 2'-дезоксирибозы, но не ограничиваясь ими), и одной-трех фосфатных групп. Как правило, полинуклеотид образован посредством фосфодиэфирных связей

между отдельными мономерами-нуклеотидами. В контексте настоящего изобретения указанные молекулы нуклеиновой кислоты включают рибонуклеиновую кислоту (РНК) и дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), но не ограничиваются ими. В настоящей заявке термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются взаимозаменяемо.

Термин «открытая рамка считывания» (ОРС) относится к последовательности нуклеотидов, которые могут быть трансформированы в аминокислоты. Как правило, такая ОРС содержит стартовый кодон, последующую область, длина которой обычно кратна 3 нуклеотидам, но не содержит стоп-кодона (TAG, TAA, TGA, UAG, UAA или UGA) в данной рамке считывания. Как правило, ОРС возникают естественным образом или сконструированы искусственно, т.е. генно-технологическими способами. ОРС кодирует белок, в котором аминокислоты, в которые ее можно трансформировать, образуют цепь с пептидными связями.

В настоящей заявке термины «белок» и «полипептид» используются взаимозаменяемо и означают любую связанную пептидными связями цепь аминокислот, вне зависимости от ее длины или посттрансляционной модификации. Белки, пригодные для применения в настоящем изобретении (включая производные белков, варианты белков, фрагменты белков, сегменты белков, эпитопы белков и домены белков), можно дополнительно модифицировать посредством химической модификации. Это означает, что такой химически модифицированный полипептид содержит химические группы, отличающиеся от 20 встречающихся в природе аминокислот. Примеры таких других химических групп включают, без ограничения, гликозилированные аминокислоты и фосфорилированные аминокислоты. Химические модификации полипептида могут обеспечить выгодные свойства по сравнению с исходным полипептидом, например, одно или более из повышенной стабильности, увеличенного биологического периода полужизни или увеличенной растворимости в воде. Химические модификации, применимые к вариантам, пригодным для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения: ПЭГилирование, гликозилирование негликозилированных исходных полипептидов, ковалентное связывание с терапевтическими низкомолекулярными соединениями, например, агонистами глюкагон-подобного пептида 1, включая эксенатид, альбиглутид, таспоглутид, ингибиторы DPP4, инкретин и лираглутид, или модификации профиля гликозилирования в исходном полипептиде. Такие химические модификации,

применимые к вариантам, пригодным для применения в настоящем изобретении, могут происходить во время или после трансляции.

Термин «аминокислота» охватывает встречающиеся в природе аминокислоты, а также производные аминокислот. Гидрофобная неароматическая аминокислота в контексте настоящего изобретения предпочтительно представляет собой любую аминокислоту с индексом гидрофобности Кайта-Дулиттла более 0,5, более предпочтительно более 1,0, еще более предпочтительно более 1,5, которая не является ароматической. Гидрофобная неароматическая аминокислота в контексте настоящего изобретения предпочтительно выбрана из группы аминокислот, состоящей из аланина (индекс гидрофобности Кайта-Дулиттла 1,8), метионина (индекс гидрофобности Кайта-Дулиттла 1,9), изолейцина (индекс гидрофобности Кайта-Дулиттла 4,5), лейцина (индекс гидрофобности Кайта-Дулиттла 3,8) и валина (индекс гидрофобности Кайта-Дулиттла 4,2) или их производных с индексом гидрофобности Кайта-Дулиттла, заданным выше.

В настоящей заявке термин «вариант» используется для обозначения полипептида, который отличается от полипептида или его фрагмента, от которого он происходит, на одно или более изменений аминокислотной последовательности. Полипептид, от которого происходит вариант белка, также называют исходным полипептидом. Аналогичным образом, фрагмент, от которого происходит вариант фрагмента белка, называют исходным фрагментом. Как правило, вариант конструируют искусственным способом, предпочтительно, генно-технологическими способами. Как правило, исходный полипептид представляет собой белок дикого типа или белковый домен дикого типа. Кроме того, варианты, пригодные для применения в настоящем изобретении, также можно получать из гомологов, ортологов или паралогов исходного полипептида или из искусственно сконструированного варианта при условии, что указанный вариант демонстрирует по меньшей мере одну биологическую активность исходного полипептида. Изменения в аминокислотной последовательности могут представлять собой аминокислотные замены, инсерции, делеции, укорочения по N-концу или C-концу или любую комбинацию этих изменений в одном или нескольких сайтах. В предпочтительных вариантах реализации вариант, пригодный для применения в настоящем изобретении, демонстрирует общее количество изменений аминокислотной последовательности до 23 (до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23) (т.е. замены, инсерции, делеции, укорочения по N-концу и/или C-концу). Замены аминокислот могут являться консервативными и/или

полуконсервативными и/или неконсервативными. В предпочтительных вариантах реализации вариант, пригодный для применения в настоящем изобретении, отличается от белка или домена, от которого он происходит, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 аминокислотные замены, предпочтительно консервативные аминокислотные замены.

Типичными заменами являются замены между алифатическими аминокислотами, между аминокислотами, содержащими алифатическую гидроксильную боковую цепь, между аминокислотами, содержащими кислые остатки, между амидными производными, между аминокислотами с основными остатками или аминокислотами, содержащими ароматические остатки. Типичные полуконсервативные и консервативные замены представляют собой:

Аминокислот	Консервативная замена	Полуконсервативная
A	G; S; T	N; V; C
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R; H
F	W; Y; L; M; H	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C
M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V	D; E; R; K; I
V	A; L; I	M; T; C; N
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

Замена A, F, H, I, L, M, P, V, W или Y на C представляет собой полуконсервативную замену, если новый цистеин остается в форме свободного тиола. Более того, специалист должен принимать во внимание, что остатки глицина в

необходимых со стерической точки зрения положениях не должны подвергаться заменам, и что Р не следует вводить в области белка, характеризующиеся альфа-спиральной или бета-складчатой структурой.

В качестве альтернативы или дополнения, «вариант» в настоящей заявке может
5 характеризоваться определенной степенью идентичности последовательности по отношению к исходному полипептиду или исходному полинуклеотиду, от которого он происходит. Точнее, вариант белка в контексте настоящего изобретения демонстрирует по меньшей мере 85% идентичности последовательности по отношению к своему
10 исходному полипептиду. Полипептид, о котором идет речь, и эталонный полипептид предпочтительно демонстрируют указанную идентичность последовательности на протяжении непрерывного фрагмента из 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более аминокислот, или на протяжении всей длины эталонного полипептида. Полинуклеотид, о котором идет речь, и эталонный полинуклеотид предпочтительно демонстрируют
15 указанную идентичность последовательности в пределах непрерывного фрагмента из 60, 90, 120, 135, 150, 180, 210, 240, 270, 300 или более нуклеотидов, или на протяжении всей длины эталонного полипептида.

Термин «по меньшей мере 85% идентичность последовательности» используется во всем настоящем описании по отношению к сравнениям полипептидной и полинуклеотидной последовательности. Данное выражение предпочтительно
20 означает по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по
25 меньшей мере 99% идентичность последовательности по отношению к соответствующему эталонному полипептиду или соответствующему эталонному полинуклеотиду.

Фрагменты белков содержат делеции аминокислот, которые могут представлять собой укорочение по N-концу, укорочение по С-концу или внутренние делеции, или
30 любую их комбинацию. Такие варианты, содержащие укорочение по N-концу, укорочение по С-концу и/или внутренние делеции, называются «фрагментами» в контексте настоящей заявки. Фрагмент может существовать в природе (например, сплайс-варианты) или может быть сконструирован искусственно, предпочтительно, генно-технологическими способами. Фрагмент (или делеционный вариант) предпочтительно содержит делецию до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 аминокислот на N-конце и/или на C-конце и/или внутри по сравнению с исходным полипептидом, предпочтительно на N-конце, на N- и C-конце или на C-конце.

Если сравнивают две последовательности и эталонная последовательность, по сравнению с которой следует рассчитывать процент идентичности последовательности, не указана, идентичность последовательности необходимо рассчитывать относительно более длинной из двух сравниваемых последовательностей, если конкретно не указано обратное.

Сходство нуклеотидных последовательностей и аминокислотных последовательностей, т.е. процент идентичности последовательности, можно определить посредством выравнивания последовательностей. Такое выравнивание можно выполнять с применением нескольких известных в данной области техники алгоритмов, предпочтительно, математического алгоритма Карлина и Альтшуля (Karlin & Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877), с помощью hmmalign (пакет HMMER, <http://hmmerr.wustl.edu/>) или алгоритма CLUSTAL (Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80) или алгоритма CLUSTALW2 (Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948), которые доступны, например, по адресу: http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html или по адресу: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Предпочтительно используют алгоритм CLUSTALW2, доступный по адресу <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, в котором используемые параметры представляют собой параметры по умолчанию, заданные по адресу <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>: Тип выравнивания = медленное, матрица массы белка = Гоннета, открытие промежутка = 10, удлинение промежутка = 0,1 для опций медленного попарного сравнения и матрица массы белка = Гоннета, открытие промежутка = 10, удлинение промежутка = 0,20, расстояния промежутков = 5, отсутствие концевых промежутков = нет, выходные опции: формат = выравнивание с номерами, порядок = выровненный).

Степень идентичности последовательности (совпадение последовательности) можно рассчитать с применением, например, программного обеспечения BLAST, BLAT или BlastZ (или BlastX). Аналогичный алгоритм встроен в программы BLASTN и BLASTP, описанные в публикации Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Поиск

белка BLAST выполняют с помощью программы BLASTP, доступной, например, по адресу

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome.

- 5 Предпочтительные используемые параметры алгоритма представляют собой параметры по умолчанию, заданные по адресу:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome:

- Ожидаемый порог = 10, размер слова = 3, макс. количество совпадений в диапазоне запроса = 0, матрица = BLOSUM62, штраф за промежуток = наличие: 11 удлинение: 1, композиционная коррекция = условная композиционная коррекция матрицы замен вместе с базой данных невырожденных белковых последовательностей (nr) для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных полипептидам фактора 1 и фактора 2.

- 15 Для получения выравнивания с промежутками для целей сравнения используют приложение Gapped BLAST, описанное в публикации Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST используют параметры по умолчанию соответствующих программ. Анализ совпадения последовательностей можно дополнить установленными способами картирования гомологии, например, Shuffle-LAGAN (Brudno M., *Bioinformatics* 2003b, 19 Suppl 1: I54-I62) или случайными полями Маркова. В настоящей заявке при упоминании процента идентичности последовательности этот процент рассчитывают относительно полной длины более длинной последовательности, если конкретно не указано обратное.

- В настоящей заявке термин «клетка-хозяин» относится к клетке, несущей нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению (например, в форме плазмиды или вируса). Такая клетка-хозяин может быть прокариотической (например, бактериальной клеткой) либо эукариотической клеткой (например, клеткой гриба, растения или животного). Клетка может быть трансформированной или не трансформированной. Клетка может представлять собой выделенную клетку, например, в культуре клеток или фрагменте ткани, которая сама по себе может быть выделенной или являться частью более сложной организационной структуры, например, органа или особи.

Термины «фактор роста миелоидного происхождения», «MYDGF», «фактор 1», «полипептид или белок MYDGF» или «полипептид или белок фактора 1»

используются взаимозаменяемо и относятся к белку, указанному в эталонной последовательности NCBI NM_019107.3 (гомолог у человека), а также к его гомологам у млекопитающих, в частности, мыши или крысы. Аминокислотную последовательность гомолога человека кодирует открытая рамка считывания 10 на 19 хромосоме человека (C19orf10). MYDGF и белок фактора 1 предпочтительно относятся к белку, содержащему, по существу состоящему или состоящему из основного сегмента фактора 1 человека, содержащего аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1.

Независимо от того, проявляет ли белок, вариант или фрагмент биологическую функцию MYDGF, его можно определить с помощью любого из анализов, описанных ниже в разделе "Примеры". Согласно настоящему изобретению, пептид или белок проявляет биологическую функцию MYDGF, если результаты, полученные с использованием такого пептида или белка, достигают по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% эффекта, зарегистрированного для MYDGF с указанными контролями, по сравнению с результатами, полученными с белком MYDGF по настоящему изобретению, показанными по меньшей мере в одном из примеров, представленных ниже.

В настоящем документе термины «MYDGF» и «Mydgf» обозначают фактор роста миелоидного происхождения, причем «MYDGF» используется в настоящей заявке для обозначения варианта человека, а «Mydgf» используется для обозначения варианта фактора роста миелоидного происхождения мыши.

В настоящем документе термин «улучшение функции сердца» означает, например, улучшение систолической и/или диастолической функции сердца, которое можно оценить, например, с помощью эхокардиографии, магнитно-резонансной томографии сердца, компьютерной томографии сердца или желудочковой ангиографии. Например, увеличение размеров левого желудочка и систолической функции сердца указывает на улучшение сердечной функции и может быть измерено, например, в соответствии с описанием, приведенным ниже в примере 10.

Термин «фиброз» описывает образование фиброзной ткани как репаративный или реактивный процесс, в отличие от образования фиброзной ткани как нормального компонента органа или ткани. Он имеет значение, например, заданное в Farlex Partner Medical Dictionary, в The American Heritage Medical Dictionary или в Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 261th ed., 2007.

Термин «гипертрофия» описывает аномальное увеличение объема органа или ткани за счет увеличения составляющих его клеток. В отличие от гиперпролиферации, гипертрофия характеризует увеличение объема ткани или органа исключительно за счет увеличения существующих клеток, а не за счет высокой скорости пролиферации клеток путем быстрого деления. В настоящем документе термин «гипертрофия» имеет значение, например, заданное в Farlex Partner Medical Dictionary, в The American Heritage Medical Dictionary или в Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 261th ed., 2007. Гипертрофию можно оценить или измерить путем сравнения, например, площади поверхности, площади поперечного сечения или размера клеток или ткани, пораженной гипертрофией, с площадью поверхности, площадью поперечного сечения или размером контрольных клеток или ткани, не пораженной гипертрофией, или путем сравнения содержания белка пораженных клеток с контролем. Гипертрофия, подлежащая лечению согласно настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой патологическую гипертрофию, например, гипертрофию, вызванную ET1 и/или Ang II, которые, как известно, способствуют развитию патологического типа гипертрофии сердца.

Термин "интерстициальная болезнь легких" или "ИБЛ" следует понимать согласно описанию в Lederer et al., New England Journal of Medicine, 2018, Vol. 378(19):1811-1823, или in van Cleemput, J. et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis for Cardiologists: Differential Diagnosis, Cardiovascular Comorbidities, and Patient Management; Adv Ther. 2019 Feb;36(2):298-317.

В настоящем документе термин «сердечная недостаточность» и в контексте «лечения и/или профилактики сердечной недостаточности» следует понимать в соответствии с определением, приведенным в 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure (European Heart Journal, 2016; Vol. 37(27):2129-2200), причем он включает хроническую сердечную недостаточность, сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечную недостаточность с уменьшенной фракцией выброса (HFrEF), сердечную недостаточность с фракцией выброса среднего диапазона (HFmrEF). В контексте настоящего изобретения этот термин также предназначен для обозначения HFpEF или HFrEF и, в частности, HFpEF стадии C или стадии D и HFrEF стадии C или стадии D, описанных в 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure (Journal of American College of Cardiology, 2017; Vol. 70(6):776-803). Описание вариантов реализации изобретения содержит дополнительные

определения и пояснения терминов, используемых во всей заявке. Эти описания и определения действительны для всей заявки, если не указано иное.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

5 Последовательности, используемые в настоящем изобретении, перечислены ниже.

SEQ ID NO: 1 (аминокислотная последовательность фактора 1 человека, не содержащая N-концевой сигнальный пептид из 31 АК):

10 VSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHNVGPGDKYTCMFTYASQGGTNEQWQMSLG
TSEDHQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAIEVRGAEIEYAMAYSKAAFERESDVP
LKTEEFVTKTAVAHRPGAFKAELSKLVIVAKASRTEL

15 SEQ ID NO: 2 (аминокислотная последовательность гомолога фактора 1 мыши, не содержащая N-концевого сигнального пептида из 24 АК):

VSEPTTVPFVDRPGGVVHSFSQDVGPNGKFTCTFTYASQGGTNEQWQMSLGT
SEDSQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAELRGAEIEYAMAYSKAAFERESDVPL
KSEEFVTKTAVSHRPGAFKAELSKLVIVAKAARSEL

20 SEQ ID NO:3 (аминокислотная последовательность фактора 1 человека, включая N-концевой сигнальный пептид (показан полужирным подчеркнутым шрифтом); UniProtKB - Q969H8):

MAAPSGGWNGVGASLWAALLLGAVALRPAEAVSEPTTVAFDVRPGGVVH
SFSHNVGPGDKYTCMFTYASQGGTNEQWQMSLGTSEDHQHFTCTIWRPQGGK
25 SYLYFTQFKAIEVRGAEIEYAMAYSKAAFERESDVPLKTEEFVTKTAVAHRPG
AFKAELSKLVIVAKASRTEL

30 SEQ ID NO: 4 (аминокислотная последовательность гомолога фактора 1 мыши, включая N-концевой сигнальный пептид (обозначен полужирным подчеркнутым шрифтом); UniProtKB - Q9CPT4):

MAAPSGGFWTAVVLAALAAALKLAAAVSEPTTVPFVDRPGGVVHSFSQDVGP
GNKFTCTFTYASQGGTNEQWQMSLGTSEDSQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFK
AELRGAEIEYAMAYSKAAFERESDVPLKSEEFVTKTAVSHRPGAFKAELSKL
VIVAKAARSEL

В SEQ ID NO: 5 показана нуклеотидная последовательность фактора 1 человека, кодирующая MYDGF SEQ ID NO: 3 (NCBI Gene ID: 56005).

5 В SEQ ID NO: 6 показана нуклеотидная последовательность фактора 1 мыши, кодирующая Mydgm SEQ ID NO: 4 (NCBI Gene ID: 28106).

ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ

10 Далее по тексту описаны элементы настоящего изобретения. Данные элементы перечислены с конкретными вариантами реализации, однако следует понимать, что данные элементы можно объединять любым способом и в любом количестве, получая дополнительные варианты реализации. Не следует считать, что различным образом описанные примеры и предпочтительные варианты реализации ограничивают
15 настоящее изобретение исключительно вариантами реализации, описанными в явном виде. Следует понимать, что данное описание поддерживает и охватывает варианты реализации, которые объединяют в явном виде описанные варианты реализации с любым количеством описанных и/или предпочтительных элементов. Более того, любые перестановки и комбинации всех описанных в настоящей заявке элементов следует
20 считать раскрытыми в описании настоящей заявки, если контекст не диктует обратное.

Авторы настоящего изобретения впервые демонстрируют антифиброзное и антигипертрофическое действие MYDGF. Авторы изобретения, в частности, демонстрируют, что введение MYDGF в модели мыши ингибирует гипертрофию и фиброз. Эти эффекты можно применять, в частности, для улучшения функции сердца.
25 Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к белку фактора роста миелоидного происхождения (MYDGF) или его фрагменту или варианту, проявляющему биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к белку фактора роста миелоидного происхождения (MYDGF) или его фрагменту или варианту, демонстрирующему биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности. В соответствии с предпочтительным вариантом реализации, сердечная недостаточность представляет собой хроническую
30 сердечную недостаточность или острую сердечную недостаточность, причем острая

сердечная недостаточность не включает инфаркт миокарда. В соответствии с предпочтительным вариантом реализации, острая сердечная недостаточность представляет собой острую сердечную недостаточность, вызванную перегрузкой давлением. Кроме того, в настоящем изобретении предложен MYDGF или его фрагмент или его вариант для указанного применения, причем сердечная недостаточность или хроническая сердечная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечную недостаточность с уменьшенной фракцией выброса (HFrEF), сердечную недостаточность с фракцией выброса среднего диапазона (HFmrEF). Безотносительно к теоретическим представлениям, ослабление фиброза и/или гипертрофии, ассоциированной с сердечной недостаточностью и/или улучшением сердечной функции, приводит к лечению или профилактике сердечной недостаточности.

В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения указанный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент. Указанный белок предпочтительно обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью по отношению к SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте реализации этого аспекта изобретения указанный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, ее фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF и характеризующийся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1. Специалист в данной области техники может без лишних затрат решить, какие положения в исходном полипептиде можно мутировать, в какой степени и какие положения должны быть сохранены для сохранения функциональности полипептида. Такую информацию можно, например, получить из гомологичных последовательностей, которые можно выявить, выровнять и проанализировать с помощью биоинформатических способов, хорошо известных в данной области техники. Такие анализы в качестве примера описаны в примере 7 и на фигурах 6 и 7 WO 2014/111458. Мутации предпочтительно вводят в те области белка, которые не являются полностью консервативными у различных видов, предпочтительно млекопитающими. В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения белок MYDGF содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF. Указанный белок предпочтительно

обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает варианты с N-концевой делецией, в которых может, например, отсутствовать одна или более аминокислот из аминокислотных положений 1-24 (на основе SEQ ID NO: 1), т.е. из N-концевой консервативной области.

Настоящее изобретение также охватывает варианты с C-концевой делецией, в которых может, например, отсутствовать одна или более аминокислот из аминокислотных положений 114-142 (на основе SEQ ID NO: 1).

С другой стороны, аминокислоты можно добавлять к белку MYDGF. Такие добавления включают добавления на N-конце, на C-конце, в пределах аминокислотной последовательности или их комбинации. Таким образом, белок согласно первому аспекту настоящего изобретения может дополнительно содержать дополнительные аминокислотные последовательности, например, для стабилизации или очистки полученного белка. Примерами таких аминокислот являются 6xHis-маркеры, тус-маркеры или FLAG-маркеры, хорошо известные в данной области техники, которые могут присутствовать в белке в любом положении, предпочтительно на N-конце или C-конце. Особенно предпочтительной дополнительной последовательностью является 6xHis-маркер. Указанный 6xHis-маркер предпочтительно присутствует на C-конце белка MYDGF. В зависимости от используемой системы экспрессии и, при наличии, дополнительной аминокислоты, например, маркера, описанного выше, одна или более остаточных аминокислот могут оставаться на N-конце и/или C-конце белка. Подчеркивается, что в белке MYDGF и белке MydGF согласно настоящему изобретению могут присутствовать такие артефакты, как показано, например, в Ebenhoch R. et al., Nat Commun. 2019 Nov 26;10(1):5379, и Polten F. et al., Anal Chem. 2019 Jan 15;91(2):1302-1308.

В некоторых случаях для стабилизации белка предпочтительно мутировать сайты расщепления протеазами в белке MYDGF согласно первому аспекту настоящего изобретения (см. Segers et al. Circulation 2007, 2011). Специалисту известно, как определить потенциальные сайты протеолитического расщепления в белке. Например, белковые последовательности можно отправлять на веб-сайты, обеспечивающие такой анализ, например, http://web.expasy.org/peptide_cutter/ или <http://pmap.burnham.org/proteases>. Если отправить последовательность белка согласно

SEQ ID NO: 1 на http://web.expasy.org/peptide_cutter/, то определяют следующие сайты расщепления с пониженной частотой (менее 10):

Таблица 1

5	Протеаза	Частота	Положение (по отношению к SEQ ID NO: 1)
	Протеиназа Arg-C	6	12 65 82 99 120 139
	Эндопептидаза Asp-N	4	9 27 54 101
	Клострипаин	6	12 65 82 99 120 139
	LysN	9	28 68 77 93 105 113 124 129 135
10	Пролин-эндопептидаза	3	13 66 121

Эти сайты можно изменять с целью удаления последовательности распознавания/расщепления соответствующей выявленной протеазы для увеличения периода полужизни белка в сыворотке.

15 В настоящем изобретении показано, что MYDGF ингибирует или предотвращает фиброз, в частности, фиброз сердца. Соответственно, в настоящем изобретении предложен белок MYDGF, или его фрагмент, или его вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике фиброза.

20 Лечение или профилактика фиброза в контексте настоящего изобретения означает, например, уменьшение количества фиброзной ткани или профилактику или уменьшение образования фиброзной ткани. Снижение предпочтительно представляет собой снижение по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% по сравнению с

25 контрольной тканью, не обработанной активным агентом.

Безотносительно к теоретическим представлениям, MYDGF ингибирует трансформирующий фактор роста β , который является универсальным профиброзным фактором роста, что приводит к профилактике и/или лечению фиброза.

В настоящем изобретении также показано, что MYDGF ингибирует или

30 предотвращает гипертрофию, в частности, гипертрофию кардиомиоцитов. Соответственно, в настоящем изобретении предложен белок MYDGF, или его фрагмент, или его вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике гипертрофии. В случае лечения или профилактики гипертрофии кардиомиоцитов указанные кардиомиоциты

предпочтительно представляют собой кардиомиоциты левого или правого желудочка или кардиомиоциты предсердий сердца.

Лечение и/или профилактику гипертрофии и фиброза ткани и/или клеток сердца, например, кардиомиоцитов, также можно применять для улучшения функции сердца.

- 5 Таким образом, в настоящем изобретении также предложен MYDGF для применения с целью улучшения функции сердца. Функция сердца в настоящем изобретении относится к систолической и/или диастолической функции сердца, которую можно оценить, например, с помощью эхокардиографии, магнитно-резонансной томографии сердца, компьютерной томографии сердца или желудочковой ангиографии.
- 10 Предпочтительным способом оценки функции сердца является двумерная трансторакальная эхокардиография с высоким разрешением (например, описанная, например, в Lang et al., Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2015;16:233-270), например, у мышей с использованием линейного 30 МГц датчика (Vevo 3100, VisualSonics). В таком эксперименте конечную диастолическую площадь левого желудочка (LVEDA) и
- 15 конечную систолическую площадь левого желудочка (LVESA) определяют в проекции длинной оси. LVEDA (мм²) представляет собой двумерное приближение конечно-диастолического объема левого желудочка; LVESA (мм²) представляет собой двумерное приближение конечно-систолического объема левого желудочка. Затем рассчитывают фракционное изменение площади (FAC) как меру систолической
- 20 функции, т.е. насосной или сократительной функции сердца $[(LVEDA - LVESA)/LVEDA] \times 100$. Таким образом, улучшение функции сердца означает улучшение систолической и/или диастолической функции сердца, измеренное, например, путем оценки FAC, по меньшей мере на 10% или более, например, на 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,
- 25 100% или более чем на 100%, например, на 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% или более по сравнению с функцией того же сердца до обработки MYDGF согласно настоящему изобретению.

- Белок MYDGF может дополнительно содержать дополнительные аминокислотные последовательности, например, для стабилизации или очистки
- 30 полученного белка. Например, для стабилизации белка предпочтительно мутировать сайты расщепления протеазой в белке MYDGF. Подходящие сайты протеолитического расщепления можно выявлять, как описано выше.

Указанный белок или композиции MYDGF, содержащие указанный белок, можно вводить *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*, предпочтительно *in vivo*.

Клетки или ткани, являющиеся фиброзными или гипертрофическими, предпочтительно принадлежат определенной системе организма индивида, выбранной из группы, включающей пищеварительную, эндокринную, выделительную, иммунную, кожную, мышечную, нервную, половую, дыхательную и скелетную системы или их комбинации, или получены из нее. В качестве альтернативы клетки или ткань, являющиеся фиброзными или гипертрофическими, предпочтительно принадлежат определенной части или органу тела индивида, выбранных из группы, включающей: кожу, кость, сердце, хрящ, сосуд, пищевод, желудок, кишечник, железу, печень, почки, легкие, головной мозг и селезенку. В особенно предпочтительном варианте реализации клетки или ткань принадлежат сердцу или получены из сердца.

Клетки или ткани, являющиеся фиброзными или гипертрофическими, могут являться поврежденными или пораженными заболеванием клетками или тканью. Предпочтительно указанное повреждение или заболевание вызвано генетическим/наследственным заболеванием или приобретенным заболеванием, вызванным, например, ишемией, реперфузионным повреждением, воспалением, инфекцией, травмой, механической перегрузкой, интоксикацией или хирургическим вмешательством. В особенно предпочтительном варианте реализации повреждение вызвано инфарктом, в частности инфарктом миокарда. В еще одном особенно предпочтительном варианте реализации повреждение вызвано реперфузионным повреждением.

В особенно предпочтительном варианте реализации клетки или ткани, пораженные фиброзом, выбраны из группы, состоящей из клеток или ткани сердца, почек, легких и печени, наиболее предпочтительно клеток или ткани сердца. Результаты, показанные в примерах 15-18, основанных на клетках пациентов с ИЛФ, в значительной степени предполагают применимость при фиброзе в контексте ИЛБ. Результаты, показанные в примерах 21 и 22 на основе эмбриональных фибробластов, предполагают применимость и для других тканей, например, при фиброзе почек и печени.

В предпочтительном варианте реализации фиброз представляет собой интерстициальную болезнь легких (ИБЛ). Согласно одному предпочтительному варианту реализации ИБЛ представляет собой прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких и, более предпочтительно, идиопатический легочный фиброз (ИЛФ). Таким образом, согласно одному варианту реализации белок MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию

MYDGF, предназначен для применения при профилактике или лечении интерстициальных заболеваний легких, определения которых приведены в источниках Lederer et al., New England Journal of Medicine, 2018, Vol. 378(19):1811-1823, и van Cleemput, J. et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis for Cardiologists: Differential Diagnosis, Cardiovascular Comorbidities, and Patient Management. Adv Ther. 2019 Feb;36(2):298-317.

Согласно дополнительному варианту реализации ИБЛ представляет собой прогрессирующую фиброзирующую ИБЛ (PF-ILD) и, в частности, идиопатическую неспецифическую интерстициальную пневмонию (iNSIP), неклассифицируемую идиопатическую интерстициальную пневмонию (неклассифицируемую ИП), идиопатическую пневмонию с аутоиммунными признаками (IPAF), хронический гиперчувствительный пневмонит (CHP), вызванные факторами среды/профессиональные фиброзирующие заболевания легких, интерстициальную болезнь легких с системным склерозом (SSc-ILD) или интерстициальную болезнь легких (RA-ILD) с ревматоидным артритом.

В особенно предпочтительном варианте реализации клетки или ткань, подверженные гипертрофии, представляют собой клетки или ткань сердца, более предпочтительно кардиомиоциты.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие белок MYDGF, или его фрагмент, или его вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, описанный в настоящем документе, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии. В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие белок MYDGF, или его фрагмент, или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, описанный в настоящем документе, для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности. Нуклеиновые кислоты для применения согласно настоящему изобретению предпочтительно кодируют аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

Нуклеотидные последовательности можно оптимизировать в попытке усилить их экспрессию в клетке-хозяине. Параметры, которые необходимо учитывать, включают содержание C:G, предпочтительные кодоны и отсутствие ингибиторной вторичной структуры. Эти факторы можно комбинировать различными способами в попытке получить нуклеотидные последовательности, характеризующиеся повышенной экспрессией в конкретном хозяине (см., например, Donnelly et al.,

международная публикация № WO 97/47358). Способность конкретной последовательности к повышенной экспрессии в конкретном хозяине включает некоторые эмпирические эксперименты. Такое экспериментирование включает измерение экспрессии предполагаемой нуклеотидной последовательности и, при необходимости, изменение последовательности. Начиная с конкретной аминокислотной последовательности и с учетом известной вырожденности генетического кода, можно получить большое количество различных кодирующих нуклеотидных последовательностей. Вырожденность генетического кода возникает из-за того, что почти все аминокислоты кодируются различными комбинациями нуклеотидных триплетов или «кодонов». Трансляция конкретного кодона в конкретную аминокислоту хорошо известна в данной области техники (см., например, Lewin GENES IV, p. 119, Oxford University Press, 1990).

Нуклеиновая кислота для применения согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать элемент контроля транскрипции или последовательности контроля экспрессии, размещенные с целью контроля экспрессии белка. Такую нуклеиновую кислоту вместе с элементами контроля часто называют системой экспрессии. В настоящем документе термин «система экспрессии» относится к системе, предназначенной для продукции одного или более представляющих интерес продуктов гена. Как правило, такая система сконструирована «искусственно», т.е. с помощью генно-технологических средств, пригодных для получения продукта гена, представляющего интерес, *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. Термин «система экспрессии» дополнительно охватывает экспрессию продукта гена, представляющего интерес, включающую транскрипцию полинуклеотидов, сплайсинг мРНК, трансляцию в полипептид, модификацию полипептида или белка во время или после трансляции, а также обеспечение адресного воздействия белка на один или более компартментов внутри клетки, секрецию из клетки и поглощение белка в той же или другой клетке. Это общее описание относится к системам экспрессии для применения в эукариотических клетках, тканях или организмах. Системы экспрессии для прокариотических систем могут отличаться от вышеописанного варианта, причем в данной области техники хорошо известно, как сконструирована система экспрессии для прокариотических клеток.

Регуляторные элементы, присутствующие в кассете для экспрессии генов, как правило, включают: (а) промотор, транскрипционно связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид, (b) 5'-сайт связывания рибосом,

функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, (с) терминатор, связанный с 3'-концом нуклеотидной последовательности, и (d) 3'-сигнал полиаденилирования, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью.

Кроме того, могут присутствовать дополнительные регуляторные элементы, которые можно применять для усиления или регуляции экспрессии генов или процессинга полипептидов. Промоторы представляют собой генетические элементы, распознаваемые РНК-полимеразой и опосредующие транскрипцию областей, расположенных после них. Предпочтительными промоторами являются сильные промоторы, обеспечивающие повышенные уровни транскрипции. Примерами сильных промоторов являются немедленный ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV) и CMV с интроном A (Chapman et al, Nucl. Acids Res. 19:3979-3986, 1991). Дополнительные примеры промоторов включают природные промоторы, например, промотор альфа EF1, промотор CMV мыши, промотор вируса саркомы Рауса и ранние/поздние промоторы SV40 и промотор [бета]-актина; и искусственные промоторы, например, синтетический мышечно-специфический промотор и химерный мышечно-специфический/CMV промотор (Li et al., Nat. Biotechnol. 17:241-245, 1999, Hagstrom et al., Blood 95:2536-2542, 2000).

Сайт связывания рибосом расположен в кодоне инициации или рядом с ним. Примеры предпочтительных сайтов связывания рибосом включают CCACCAUGG, CCGCCAUGG и ACCAUGG, где AUG представляет собой кодон инициации (Kozak, Cell 44:283-292, 1986). Сигнал полиаденилирования отвечает за расщепление транскрибируемой РНК и добавление поли(А)-хвоста к РНК. Сигнал полиаденилирования у высших эукариот содержит последовательность AAUAAA за приблизительно 11-30 нуклеотидов от сайта добавления полиаденилирования. Последовательность AAUAAA участвует в сигнальном расщеплении РНК (Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY, 1990). Поли(А)-хвост важен для процессинга, экспорта из ядра, трансляции и стабильности мРНК.

Сигналы полиаденилирования, которые можно использовать в составе кассеты экспрессии генов, включают минимальный сигнал полиаденилирования [бета]-глобина кролика и сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (BGH) (Xu et al., Gene 272:149-156, 2001, Post et al., патент США US 5122458).

Примеры дополнительных регуляторных элементов, которые можно применять для усиления или регуляции экспрессии генов или процессинга полипептидов и которые могут присутствовать в кассете, включают энхансер, лидерную

последовательность и оператор. Энхансерная область усиливает транскрипцию. Примеры энхансерных областей включают энхансер CMV и энхансер SV40 (Hitt et al., Methods in Molecular Genetics 7:13-30, 1995 , Xu, et al., Gene 272:149-156, 2001). Энхансерная область может быть связана с промотором.

5 Экспрессия белка MYDGF или его варианта согласно настоящему изобретению может быть регулируемой. Таковую регуляцию можно осуществлять на многих этапах экспрессии гена. Возможные этапы регуляции включают, например, инициацию транскрипции, высвобождение промотора, элонгацию транскрипции, сплайсинг, экспорт из ядра, стабильность мРНК, инициацию трансляции, эффективность
10 трансляции, элонгацию трансляции и фолдинг белка, но не ограничиваются ими. Другие этапы регуляции, влияющие на концентрацию полипептида MYDGF внутри клетки, влияют на период полужизни белка. Такой этап регуляции представляет собой, например, регулируемую дегенерацию белков. Поскольку белки согласно настоящему изобретению включают секретируемые белки, белок может направляться в
15 секреторный путь клетки-хозяина. Эффективность секреции регулирует, вместе с этапами регуляции, относящимися к экспрессии и стабильности белка, концентрацию соответствующего белка вне клетки. "Вне клетки" может относиться, например, к культуральной среде, ткани, внутриклеточному матриксу или пространству или биологической жидкости, например, крови или лимфе, но не ограничивается ими.

20 Контроль вышеупомянутых регуляторных этапов может быть, например, независимым от типа клеток или тканей или специфичным для типа клеток или тканей. В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения контроль регуляторных стадий является специфичным для типа клеток или тканей. Такая специфичная для типа клеток или тканей регуляция предпочтительно осуществляется
25 посредством этапов регуляции, относящихся к транскрипции нуклеиновой кислоты. Эту регуляцию транскрипции можно осуществлять путем применения клетко- или тканеспецифичных промоторных последовательностей. Результат этой клеточной или тканевой регуляции может характеризоваться различной степенью специфичности. Это означает, что экспрессия соответствующего полипептида усиливается в
30 соответствующей клетке или ткани по сравнению с клетками или тканями другого типа или что экспрессия ограничена клетками или тканями соответствующего типа. Специфические для типа клеток или тканей промоторные последовательности хорошо известны в данной области техники и доступны для широкого спектра типов клеток или тканей.

Экспрессия не обязательно является специфичной для типа клеток или тканей, но может зависеть от физиологического состояния. Такие состояния представляют собой, например, воспаление или рану. Такой экспрессии, специфичной для физиологического состояния, также можно достигать посредством регуляции на всех
5 вышеупомянутых этапах. Предпочтительным способом регуляции экспрессии, специфичной для физиологического состояния, является транскрипционная регуляция. Для этого можно применять специфичный для раны или воспаления промотор. Соответствующие промоторы представляют собой, например, встречающиеся в природе последовательности, которые можно, например, получить из генов,
10 специфически экспрессирующихся во время иммунной реакции и/или регенерации раневых тканей. Еще одна возможность представляет собой применение искусственных промоторных последовательностей, которые, например, сконструированы посредством комбинации двух или более встречающихся в природе последовательностей.

Регуляция может быть специфичной для типа клеток или тканей и
15 физиологического состояния. В частности, экспрессия может представлять собой экспрессию, специфичную для сердца. Экспрессия предпочтительно является специфичной для сердца и/или раны.

Еще одной возможностью регуляции экспрессии белка MYDGF или его варианта согласно настоящему изобретению является условная регуляция экспрессии
20 гена. Для условной регуляции можно использовать последовательность оператора. Например, последовательность оператора Tet можно использовать для подавления экспрессии генов. Условная регуляция экспрессии генов с помощью оператора Tet вместе с репрессором Tet хорошо известна в данной области техники, и разработано большое количество соответствующих систем для широкого спектра прокариотических
25 и эукариотических организмов. Специалист в данной области техники знает, как выбрать подходящую систему и адаптировать ее к особым потребностям соответствующего варианта применения.

В особенно предпочтительном варианте реализации применение нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению включает применение по отношению к
30 индивиду, предпочтительно индивиду, страдающему фиброзом или гипертрофией.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложены векторы, содержащие нуклеиновую кислоту или систему экспрессии, описанную в настоящем документе, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии, или для применения при лечении сердечной недостаточности.

В настоящей заявке термин «вектор» относится к белку или полинуклеотиду или их смеси, которые можно внедрять или которые могут внедрять в клетку белки и/или нуклеиновую кислоту, содержащиеся в них. В контексте настоящего изобретения гены, представляющие интерес, кодируемые внедренным полинуклеотидом, экспрессируются в клетке-хозяине при внедрении вектора или векторов. Примеры подходящих векторов включают плазмидные векторы, космидные векторы, фаговые векторы, например, на основе фага лямбда, векторы на основе нитчатых фагов, вирусные векторы, вирусоподобные частицы и бактериальные споры, но не ограничиваются ими.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. Подходящие вирусные векторы включают аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), альфавирусные векторы, герпесвирусные векторы, векторы на основе вируса кори, поксвирусные векторы, векторы на основе вируса везикулярного стоматита, ретровирусные векторы и лентивирусные векторы.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вектор представляет собой аденовирусный вектор или вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

Нуклеиновые кислоты, кодирующие один или более белков MYDGF или их вариантов согласно настоящему изобретению, можно внедрять в клетку-хозяина, ткань или организм индивида, используя векторы, подходящие для терапевтического введения. Подходящие векторы предпочтительно могут доставлять нуклеиновые кислоты в клетку-мишень, не вызывая непереносимого побочного эффекта.

В особенно предпочтительном варианте реализации применение вектора согласно настоящему изобретению включает применение по отношению к индивиду, нуждающемуся в этом.

Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие белок MYDGF или его фрагменты или варианты, проявляющие биологическую функцию MYDGF, описанную выше, предпочтительно предназначены для применения при лечении или профилактике фиброза, гипертрофии или для применения при лечении сердечной недостаточности.

Согласно дополнительному аспекту, в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая вектор, описанный в настоящем документе, и экспрессирующая нуклеиновую кислоту, кодирующую белок MYDGF или его

фрагмент или его вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике фиброза, гипертрофии, или для применения при лечении сердечной недостаточности.

Согласно дополнительному аспекту, в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие белок MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, и, необязательно, подходящее фармацевтическое вспомогательное вещество, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии, или для применения при лечении сердечной недостаточности.

В настоящем документе термин «подходящее фармацевтическое вспомогательное вещество» относится к фармакологически неактивному веществу, например, разбавителю, вспомогательному веществу, поверхностно-активным веществам, стабилизаторам, физиологическим буферным растворам или средам-носителям, с которыми вводят терапевтически активный ингредиент, но не ограничивается ими. «Фармацевтические вспомогательные вещества» также называются «фармацевтическими носителями» и могут быть жидкими или твердыми. Жидкие носители включают стерильные жидкости, например, растворы хлорида натрия в воде или маслах, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п., но не ограничиваются ими. Растворы хлорида натрия и водные растворы декстрозы и глицерина также можно применять в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Раствор хлорида натрия является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны E. W. Martin в «Remington 's Pharmaceutical Sciences». В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения носитель представляет собой подходящее фармацевтическое вспомогательное вещество. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Такие подходящие фармацевтические вспомогательные вещества предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми.

«Фармацевтически приемлемый» означает одобренный нормативно-правовым органом федеральной или региональной власти или приведенный в Фармакопее США

или иной общепризнанной фармакопее для применения у животных, и в более конкретном случае у людей.

Термин «композиция» предназначен для включения состава активного соединения с инкапсулирующим материалом в качестве носителя, обеспечивающего капсулу, в которой активный компонент с другими носителями или без них окружен данным носителем, который, таким образом, находится в ассоциации с активным соединением.

Термин «активный ингредиент» относится к веществу в фармацевтической композиции или составе, которое является биологически активным, т.е. обеспечивает фармацевтическую значимость. В контексте настоящего изобретения активный ингредиент представляет собой белок MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF. Фармацевтическая композиция может содержать один или более активных ингредиентов, которые могут действовать совместно или независимо друг от друга. Активный ингредиент может быть составлен в виде нейтральной или солевой формы. Солевая форма предпочтительно представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится, например, к соли полипептидов MYDGF согласно настоящему изобретению, включая их фрагменты и варианты, описанные в настоящем документе, но не ограничивается ими. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты, которые могут, например, быть образованы путем смешивания раствора полипептида согласно настоящему изобретению с раствором фармацевтически приемлемой кислоты, например, соляной кислоты, серной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты, бензойной кислоты, лимонной кислоты, винной кислоты, угольной кислоты или фосфорной кислоты. Кроме того, если пептид несет кислотную группу, его подходящие фармацевтически приемлемые соли могут включать соли щелочных металлов (например, соли натрия или калия); соли щелочноземельных металлов (например, соли кальция или магния); и соли, образованные подходящими органическими лигандами (например, катионы аммония, четвертичные аммониевые и аминные катионы, образованные с помощью противоионов, например, галогенида, гидроксида, карбоксилата, сульфата, фосфата, нитрата, алкилсульфоната и арилсульфоната). Типичные примеры фармацевтически приемлемых солей включают ацетат, адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, бисульфат, битартрат, борат, бромид, бутират,

эдетат кальция, камфорат, камфорсульфонат, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, клавуланат, циклопентанпропионат, диглюконат, дигидрохлорид, додецилсульфат, эдетат, эдизилат, эстолат, эзилат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюцептат, глюкогептоноат, глюконат, глутамат, глицерофосфат, гликолиларсанилат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, гидроксинафтоат, иодид, изотионат, лактат, лактобионат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, манделат, мезилат, метансульфонат, метилсульфат, мукат, 2-нафталинсульфонат, нафзилат, никотинат, нитрат, аммониевую соль N-метилглюкамина, олеат, оксалат, памоат (эмбонат), пальмитат, пантотенат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат/дифосфат, пикрат, пивалат, полигалактуронат, пропионат, салицилат, стеарат, сульфат, субацетат, сукцинат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат, триэтиодид, ундеканоат, валерат и т.п., но не ограничиваются ими (см., например, S. M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 66, pp. 1-19 (1977)).

Согласно одному варианту реализации активный ингредиент вводят в клетку, ткань или организм индивида в эффективном количестве. «Эффективное количество» представляет собой количество активного ингредиента, достаточное для достижения намеченной цели. Активный ингредиент может представлять собой терапевтический агент. Эффективное количество данного активного ингредиента зависит от таких параметров, как природа ингредиента, путь введения, размер и вид индивида, получающего активный ингредиент, и цели введения. Опытный специалист может определить эффективное количество в каждом отдельном случае в соответствии со способами, принятыми в данной области техники. В контексте настоящего изобретения термин «введение» включает введение *in vivo* индивиду, а также введение непосредственно в клетки или ткани *in vitro* или *ex vivo*.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции адаптированы для лечения заболевания или расстройства. В настоящем документе термин «лечить» или «лечение» заболевания или расстройства означает достижение одного или более следующих результатов: (a) снижения тяжести расстройства; (b) ограничения или предотвращения развития симптомов, характерных для расстройства (расстройств), подвергаемого(ых) лечению; (c) подавления ухудшения симптомов, характерных для расстройства (расстройств), подвергаемого(ых) лечению; (d) ограничения или профилактики повторного проявления расстройства (расстройств) у пациентов, у которых ранее наблюдалось(ись)

данное(ые) расстройство (расстройства); (е) ограничения или профилактики повторного проявления симптомов у пациентов, у которых ранее наблюдались симптомы расстройства (расстройств); (f) снижения смертности после возникновения заболевания или расстройства; (g) излечения; и (h) профилактики заболевания. Термин "лечение" также охватывает термин "улучшение". В настоящей заявке термин «предотвращать», «предотвращение» или «профилактика» заболевания или расстройства означает предотвращение возникновения такого заболевания или расстройства у пациента.

В особенно предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения лечение фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению включает лечение индивида, нуждающегося в таком лечении.

Фармацевтическую композицию, рассматриваемую в настоящем изобретении, можно составить различными способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Например, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может находиться в жидкой форме, например, в форме растворов, эмульсий или суспензий. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению предпочтительно составлена для парентерального введения, предпочтительно для внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, подкожного, чрескожного, внутрилегочного, внутрибрюшинного, внутрикоронарного, внутрисердечного введения или введения через слизистые оболочки, предпочтительно для внутривенного, подкожного или внутрибрюшинного введения. Кроме того, возможен препарат для перорального или анального введения. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению предпочтительно находится в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например, достаточное количество солей или глюкозы для придания указанному раствору изотоничности по отношению к крови. Водные растворы при необходимости должны быть подходящим образом забуферены (предпочтительно до pH от 3 до 9, более предпочтительно до pH от 5 до 7). Фармацевтическая композиция предпочтительно находится в стандартной лекарственной форме. В такой форме фармацевтическую композицию подразделяют на разовые дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Стандартная лекарственная форма может представлять собой упакованный препарат, содержащий дискретные количества фармацевтической композиции, например, флаконы или ампулы.

Фармацевтическую композицию предпочтительно вводят посредством внутривенного, внутриаартериального, внутримышечного, подкожного, трансдермального, внутрилегочного, внутрибрюшинного, внутрикоронарного или внутрисердечного пути введения, при этом также включают другие пути введения, известные в данной области техники.

Если фармацевтическую композицию используют в качестве лекарственного средства для индивида, применение фармацевтической композиции может заменить стандартное лечение соответствующего заболевания или состояния или осуществляться дополнительно к стандартному лечению. В случае дополнительного применения фармацевтической композиции указанную фармацевтическую композицию можно вводить до, одновременно или после стандартной терапии.

Кроме того, фармацевтическую композицию предпочтительно вводят однократно или более чем однократно. Это включает 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 раз. Временные рамки для введения фармацевтического средства не ограничены. Введение предпочтительно не превышает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель.

Одна доза фармацевтической композиции может независимо формировать общее количество вводимых доз, или соответствующие временные рамки введения могут включать введение в виде одной или более болюсных инъекций и/или вливаний.

В соответствии с дополнительным аспектом, в настоящем изобретении предложен способ лечения или профилактики фиброза, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества MYDGF или его фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF. В указанном способе MYDGF предпочтительно содержит SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF SEQ ID NO: 1. В этом отношении фрагмент или вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

В предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению фиброз представляет собой фиброз сердца, почки, легкого и/или печени. В соответствии с предпочтительным вариантом реализации фиброз представляет собой интерстициальное заболевание легких, более предпочтительно прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких и наиболее предпочтительно идиопатический легочный фиброз.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации указанного способа согласно настоящему изобретению белок MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

В соответствии с дополнительным аспектом, в настоящем изобретении предложен способ лечения или профилактики гипертрофии, причем указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества MYDGF или его фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF. В указанном способе MYDGF предпочтительно содержит SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF SEQ ID NO: 1. В этом отношении фрагмент или вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации способа согласно настоящему изобретению гипертрофия представляет собой гипертрофию кардиомиоцитов.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации способа по настоящему изобретению белок MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации указанного способа согласно настоящему изобретению белок MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

В соответствии с дополнительным аспектом, в настоящем изобретении предложен способ лечения или профилактики сердечной недостаточности, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фактора роста MYDGF или его фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF, причем сердечная недостаточность предпочтительно представляет собой хроническую сердечную недостаточность. В соответствии с предпочтительным вариантом реализации, в способе лечения сердечной недостаточности сердечная недостаточность или хроническая сердечная

недостаточность представляет собой HFpEF или HFrEF, причем HFpEF предпочтительно представляет собой HFpEF стадии C или стадии D, или HFrEF представляет собой HFrEF стадии C или стадии D. В этом отношении фрагмент или вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации указанного способа согласно настоящему изобретению белок MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

ПРИМЕРЫ

Примеры предназначены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения и обеспечения его лучшего понимания. Не следует считать, что они как каким-либо образом ограничивают сущность настоящего изобретения.

5

Материалы и способы, используемые в разделе **"Примеры":**

Если не указано иное, в примерах использовали следующие материалы и способы.

10

Эндотелин 1 (ET1) и ангиотензин II (Ang II) приобрели у Sigma-Aldrich, инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) мыши - у R&D Systems, а SMI4a - у Selleckchem (номер в каталоге [№] S8005). Антитела купили у Abcam (против Ca²⁺ АТФазы 2a сарко/эндоплазматического ретикулума [SERCA2a], поликлональные, № ab91032; против альфа-тубулина, клон EPR13478 (B)), Cell Signaling Technology (против бета-актина, клон 13E5; против винкулина, клон E1E9V), Eurogentech (против MYDGF мыши, поликлональные, изготовленные на заказ) (Korf-Klingebiel, 2015) и Thermo Fisher (PIM1, клон G.360.1).

15

20

Рекомбинантный MYDGF. Рекомбинантный MYDGF мыши с С-концевым 8xHis-маркером продуцировали в клетках HEK293-6E, культивируемых в среде для экспрессии FreeStyle F17 (Gibco) химически определенного состава, не содержащей веществ животного происхождения и белка (Karste et al. Methods Mol Biol. 2017;1586:313-324). Эффективность трансфекции оценивали путем совместной трансфекции контрольной плазмиды, кодирующей GFP. Супернатанты клеточной культуры (6 л) собирали центрифугированием и концентрировали в 15 раз путем диафильтрации против PBS (pH = 7,4), содержащего 300 ммоль/л NaCl (ФСБ/NaCl), в установке поперечной ультрафильтрации Proflux M12 (Millipore) с использованием фильтров Pellicon 2, 5 кДа (Millipore). Концентрат фильтровали с использованием фильтровальных капсул Sartobran 300 с размером пор 0,45/0,2 мкм (Sartorius) и добавляли азид натрия (0,05 %). MYDGF захватывали с помощью системы ÄKTA pure 25 M (Cytiva) и колонки HisTrap excel объемом 5 мл (Cytiva). Колонку промывали PBS/NaCl до достижения исходных УФ-сигналов. Фракции, элюированные имидазолом

25

30

(30 ммоль/л) и содержащие рекомбинантный белок, объединяли и концентрировали, используя установки ультрафильтрации Vivaspin 20 (5000 MWCO) (Sartorius). Белок дополнительно очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), используя колонку HiLoad 26/600 Superdex 75 (GE Healthcare). MYDGF элюировали в одном пике и концентрировали до 2 мг/мл с использованием установок ультрафильтрации Vivaspin 20 (5000 MWCO). Концентрации белка рассчитывали по коэффициенту молекулярной экстинкции ($1 \text{ мг/мл} = \text{Abs}_{280 \text{ нм}} 0,95$). Характеристики рекомбинантного белка (общий выход 5,95 мг/л) исследовали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и триптического фингерпринтинга с использованием масс-спектрометрии (Bruker). Образцы белка быстро замораживали в жидком азоте и хранили при температуре минус 80°C.

Мыши с дефектом Mydgf. Мыши с генетической делецией Mydgf (Mydgf tm1Kcw, Mouse Genome Informatics ID: 5688472) были описаны ранее. 18 животных (с фоновым генотипом BALB/c x C57BL/6J) подвергали обратному скрещиванию в течение 10 поколений с линией C57BL/6N, и поддерживали этот фоновый генотип с помощью гетерозиготных спариваний. Во всех экспериментах использовали однопометных животных. Аллели дикого типа и целевые аллели обнаруживали с помощью геномной ПЦР (Korf-Klingebiel, 2015).

Операция у мышей и оценка функции. Все хирургические процедуры были одобрены уполномоченными органами в Ганновере, Германия (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit). Мышей помещали в индивидуально вентилируемые клетки с 12-часовым циклом освещения/темноты в центральном виварии Медицинской школы Ганновера. Пищу и воду предоставляли без ограничений. Операцию по поперечному сужению аорты (ТАС) (Rockman et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88: 8277-8281) выполняли у 8-10-недельных мышей C57BL/6N. Животным предварительно подкожно вводили 0,02 мг/кг атропина (B. Braun) и 200 мг/кг метамизола (Zentiva). Анестезию индуцировали 3–4% изофлураном (Baxter) в индукционной камере. После пероральной интубации мышей подвергали искусственной вентиляции легких (Harvard Apparatus, MiniVent Type 845), анестезию поддерживали с помощью 1,5-2% изофлурана. Во время операции мышей помещали на нагревательную площадку, соединенную с регулятором температуры (Föhr Medical Instruments) для поддержания ректальной температуры на уровне 37 °C. Выполняли левую переднебоковую торакотомию под хирургическим микроскопом. После

отделения тимуса и жировой ткани от дуги аорты накладывали шов из шелка 6-0 между брахиоцефальной и левой сонной артериями и выполняли лигатуру на тупой игле 26 калибра. После завязывания узла иглу удаляли. После закрытия раны мышь отсоединяли от аппарата ИВЛ и оставляли восстанавливаться в инкубаторе при 32°C. У 5 контрольных мышей с имитационными операциями лигатуру вокруг аорты не завязывали. Мышей подвергали 3-недельному протоколу физической нагрузки посредством плавания для индуцирования физиологической гипертрофии (Heineke, Methods Mol Biol. 2013;963: 279-301).

После седации 1–2% изофлураном через дыхательную маску у мышей 10 выполняли трансторакальную 2D-эхокардиографию с помощью линейного датчика 20–46 МГц (MX400, Vevo 3100, VisualSonics). Градиенты давления в месте сужения аорты и соотношения пиковой скорости кровотока (V_{max}) в общей сонной артерии справа и слева определяли сразу после ТАС или имитационной операции с помощью доплерографии. Конечно-диастолическую площадь левого желудочка (LVEDA) и 15 конечно-систолическую площадь левого желудочка (LVESA) регистрировали в парастернальной проекции длинной оси. Фракционное изменение площади (%) рассчитывали как $[(LVEDA - LVESA) / LVEDA] \times 100$.

Для измерения объема и давления в ЛЖ мышам подкожно вводили 2 мг/кг буторфанола (Zoetis). Анестезию индуцировали 4% изофлураном. После пероральной 20 интубации мышам внутрибрюшинно вводили 0,8 мг/кг панкурония (Actavis), анестезию поддерживали 2% изофлураном. Катетер для определения проводимости с 1,4 F микроманометром на конце (SPR-839, Millar Instruments) вводили в левый желудочек через правую сонную артерию. Образцы контуров установившегося давления-объема получали с частотой 1 кГц и анализировали с помощью программного обеспечения 25 LabChart 7 Pro (ADInstruments).

Трансплантация костного мозга. Клетки костного мозга (BMC) вымывали из бедренной и большеберцовой костей 7-9-недельных мышей-доноров с Myd8f ДТ или КО Myd8f. Эритроциты удаляли лизисом с использованием NH_4Cl . 7-9-недельным 30 мышей-реципиентов с Myd8f ДТ или КО Myd8f летально облучали (9,5 Гр) и подвергали трансплантации 10⁶ BMC через хвостовую вену. После трансплантации мышам вводили ципрофлоксацин (Bayer) в течение 3 недель (100 мг/л в питьевой воде). Операцию ТАС выполняли через 7–8 недель после трансплантации. Применяя этот протокол в контрольном эксперименте, мышей-реципиентов CD45.2 летально облучали

и подвергали трансплантации BMC от мышей-доноров с конгенным CD45.1 (B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ; Jackson Laboratory). Через 8 недель более 95% лейкоцитов крови характеризовались высокой экспрессией CD45.1, как показано с помощью проточной цитометрии с использованием антител против CD45.1 (BioLegend, клон A20) (разбавление 1:16) и CD45.2 (BD Biosciences, клон 104) (1:150).²³

Перенос гена с помощью лентивируса. Лентивирус, кодирующий полноразмерный MYDGF мыши под контролем промотора tetO/CMV, и пустой контрольный вирус получали в клетках HEK 293T, как описано ранее (Lachmann et al. Gene Ther. 2013;20:298-307). Для обеспечения условной сверхэкспрессии MYDGF в воспалительных клетках, полученных из костного мозга, у 7-9-недельных мышей R26-M2rtTA, экспрессирующих белок обратного трансаактиватора, индуцируемого тетрациклином (rtTA-M2), под контролем повсеместно активного промотора Rosa26, выделяли гематопозитические стволовые клетки (HSC). С этой целью клетки костного мозга, отрицательные по заданному ростку (lin^{-}), выделяли с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) с использованием набора Lineage Cell Depletion Kit от Miltenyi Biotec. Клетки размножали в бессывороточной среде StemSpan (Stem Cell Technologies) с добавлением цитокинов (набор лигандов, интерлейкин-3, интерлейкин-11, лиганд Flt3), а затем трансдуцировали супернатантами клеток HEK 293T, содержащими лентивирусную векторную частицу, в планшетах, покрытых ретронектином (TaKaRa Bio), как описано ранее (Lachmann 2013; Kustikova et al. Exp Hematol. 2014;42:505-515 e507). Мышей-реципиентов ДТ летально облучали (9,5 Гр) и трансплантировали им 1×10^6 HSC, трансдуцированных контрольным лентивирусом или лентивирусом с MYDGF, в хвостовую вену. После трансплантации мышам вводили ципрофлоксацин в течение 3 недель. Имитационные операции или операции ТАС выполняли через 7 недель после трансплантации. Для инициации экспрессии MYDGF мышам с воспалительными клетками, происходящими от HSC и трансдуцированными лентивирусом, вводили доксициклин (2 мг/мл в питьевой воде), начиная за 1 неделю до операции.

Терапия белком MYDGF. Осмотический мининасос Alzet (модель 2004, скорость перекачивания 0,25 мкл/ч в течение 28 суток, заполненный 10 мкг MYDGF на 6 мкл или только разбавителем) помещали в подкожный межлопаточный карман непосредственно после операции ТАС. После этого вводили однократную

внутрибрюшинную болюсную инъекцию (10 мкг MYDGF или только разбавитель).

5 *Аденовирусы.* Аденовирусы, кодирующие SERCA2A или красный флуоресцентный белок DsRed, получали с помощью аденовирусной векторной системы AdEasy (Agilent Technologies). Мышам вводили аденовирусы за 5 суток до операции ТАС (1×10^{10} бляшкообразующих единиц в хвостовую вену). Непосредственно после ТАС мышам делали вторую инъекцию аденовируса.

10 *Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия с мониторингом множественных реакций с MYDGF в качестве мишени.* Концентрации MYDGF в образцах плазмы мышей и пациентов с ЭДТА определяли с помощью целевой жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/ММР-МС) (Polten et al. Anal Chem. 2019;91:1302-1308).

15 *Флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS) и проточная цитометрия.* Воспалительные клетки выделяли из левого желудочка путем ферментативного гидролиза и FACS (Hulsmans 2018; Korf-Klingebiel et al. Circ Res. 2019;125:787-801). Левые желудочки гидролизовали в течение 30 мин при 37 °C в PBS, содержащем 1 мг/мл коллагеназы D (Roche), 2,4 мг/мл диспазы (Gibco) и 100 ед/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich). Суспензии клеток фильтровали (40 мкм клеточное сито, Falcon), промывали и инкубировали в течение 5 мин при 4 °C в PBS с 4% FCS, 2 ммоль/л ЭДТА и очищенным антителом против CD16/CD32 мыши (BD Biosciences, BD Fc Block, клон 2.4G2) (1:55). Затем клетки инкубировали в течение 20 мин при 4 °C с антителами против следующих антигенов: CD45R/B220-PE (клон RA3-6B2) (1:500),
20 CD90.2/Thy-1.2-PE (клон 53-2.1) (1:2500), NK-1.1-PE (клон PK136) (1:500), CD49b/DX5-PE (клон DX5) (1:500), Ly6G-PE (клон 1A8) (1:500) и CD11b-Alexa Fluor 700 (клон M1/70) (1:50) от BD Biosciences; Ly6C-APC (клон 1G7.G10) (1:8) от Miltenyi Biotec; и CD45-Brilliant Violet 570 (клон 30-F11) (1:33), F4/80-FITC (клон BM8) (1:33), CD3-PE/Cy7 (клон 17A2) (1:33) и CD19-PerP/Cy5.5 (клон 6D5) (1:33) от BLegend. После
25 промывки клетки сортировали на приборе FACS Aria IIu (Becton Dickinson). Моноциты выявляли как CD45^{high} CD11b^{high} (CD45R/B220, CD90.2/Thy-1.2, NK 1.1, CD49b/DX5, Ly6G)^{low} F4/80^{low} Ly6C^{high}; макрофаги - как CD45^{high} CD11b^{high} (CD45R/B220, CD90.2/Thy-1.2, NK 1.1, CD49b/DX5, Ly6G)^{low} F4/80^{high} или Ly6C^{low}; нейтрофилы - как CD45^{high} CD11b^{high} (CD45R/B220, CD90.2/Thy-1.2, NK 1.1, CD49b/DX5,
30

Ly6G)high; Т-клетки - как CD45high CD11blow (CD45R/B220, CD90.2/Thy-1.2, NK 1.1, CD49b/DX5, Ly6G)high CD3high CD19low; и В-клетки - как CD45high CD11blow (CD45R/B220, CD90.2/Thy-1.2, NK 1.1, CD49b/DX5, Ly6G)high CD3high CD19. Для проточной цитометрии воспалительные клетки инкубировали с мечеными антителами, описанными выше. Затем клетки добавляли в пробирки TruCOUNT (BD Biosciences), подсчитывали на проточном цитометре LSR II (Becton Dickinson) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo вер. 10.6.

Выделение эндотелиальных клеток и фибробластов с помощью MACS. Миокард ЛЖ подвергали ферментативному гидролизу коллагеназой I (Worthington) и ДНКазой I (Sigma-Aldrich). Клеточные суспензии фильтровали (30 мкм клеточное сито, Falcon), промывали, инкубировали с микрогранулами CD45 MicroBeads и наносили на колонки LD. Проточную фракцию клеток CD45low промывали, инкубировали с микрогранулами CD146 MicroBeads и наносили на колонки LD. Эндотелиальные клетки (CD45low CD146high) элюировали с колонок и использовали для выделения РНК (набор RNeasy, Qiagen). Проточную фракцию клеток CD45low CD146low промывали, инкубировали с микрогранулами Feeder Removal MicroBeads и наносили на колонки LS. Фибробласты элюировали с колонок и использовали для выделения РНК (все реагенты и оборудование Miltenyi Biotec).

Сбор и анализ тканей. Мышей умерщвляли в различные моменты времени после операции ТАС или имитационной операции и удаляли левые желудочки. РНК выделяли с использованием наборов RNeasy (Qiagen). Белковые лизаты готовили в буфере RIPA. Срезы средней части желудочков помещали в соединение OCT (Tissue Tek), быстро замораживали в жидком азоте и хранили при температуре минус 80 °С. Получали криосрезы толщиной 6 мкм. Срезы окрашивали агглютинином зародыша пшеницы (WGA, Vector Laboratories), конъюгированным с родамином, для выделения границ кардиомиоцитов. Выполняли трассировку и оцифровку окружностей из 200-400 миоцитов для расчета средней площади поперечного сечения. Срезы окрашивали изолектином В4 GSL I (IB4, Vector Laboratories), конъюгированным с флуоресцеином, для визуализации капилляров. Изображения получали с помощью флуоресцентной микроскопии (Axio Observer.Z1). MYDGF визуализировали с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии в 6-мкм криосрезах (Leica DM IRB со сканирующей головкой TCS SP2 AOBS) после окрашивания поликлональным антителом от

Eurogentec (1:100)18 и поликлональным вторичным антителом, меченым FITC (Invitrogen, #A24532) (1:200). Срезы окрашивали антителом CD11b (Invitrogen, клон M1/70) (1:200) и поликлональным вторичным антителом, меченным Cy3 (Jackson ImmunoResearch, № 712-165-153) (1:200). В предварительных экспериментах
5 обнаружили, что все вторичные антитела давали низкие фоновые сигналы. Срезы окрашивали Sirius red (Sigma-Aldrich) для количественного определения объемной доли интерстициального коллагена с помощью световой микроскопии.

Выделение и культивирование кардиомиоцитов. Кардиомиоциты желудочка
10 взрослой мыши (AMCM) выделяли путем ферментативного гидролиза с использованием протокола Alliance for Cellular Signaling (<http://www.signaling-gateway.org/data/cgi-bin/Protocols.cgi?cat=0>). AMCM высевали на 6-луночные планшеты с ламининовым покрытием в среде 199 (Sigma-Aldrich) с добавлением 5% FCS и 10 ммоль/л монооксида 2,3-бутандиона (Sigma-Aldrich), длину и ширину клеток
15 определяли с помощью фазово-контрастной микроскопии и цифрового анализатора изображений (AxioVision, Zeiss). Кардиомиоциты желудочка новорожденной крысы (NRCM) выделяли из 1-3-дневных крыс Sprague-Dawley путем центрифугирования в градиенте плотности перколла (Shubeita et al. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. J Biol Chem. 1990;265:20555-20562). NRCM высевали на ночь на чашки для
20 культивирования с желатиновым покрытием в DMEM (Capricorn Scientific, 4 части) и среде 199 (1 часть) с добавлением 5% сыворотки лошади, 2,5% FCS, глутамина и антибиотиков. Затем клетки переключали на DMEM и среду 199 с добавлением только глутамина и антибиотиков и стимулировали различными агентами в течение 24 часов. Площадь поверхности NRCM определяли с помощью планиметрии, содержание белка -
25 с помощью анализа по Бредфорду (Bio-Rad). NRCM трансфицировали миРНК (50 пмоль/106 клеток) с использованием реагента Lipofectamine RNAiMAX и миРНК от Thermo Fisher (PIM1: № 4390771, ID: s128205; миРНК, содержащая те же нуклеотиды в иной последовательности: № 4390843, отрицательный контроль миРНК Silencer Select).

30 *Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР).* Общую РНК выделяли из клеток и тканей с помощью наборов для выделения РНК RNeasy (Qiagen) с последующей обратной транскрипцией в кДНК (обратная транскриптаза SuperScript III, Thermo Fisher); концентрации мРНК определяли с помощью анализов с TaqMan или SYBR green (отжиг при 60 °C в течение 1 мин;

удлинение при 72 °C в течение 1 мин) (все реагенты от Thermo Fisher). Данные анализировали с использованием стандартных кривых (TaqMan) или относительного количественного определения (SYBR green).

5 *Подготовка образцов для протеомики и фосфопротеомики.* После стимуляции NRCM (2×10^6 клеток на повторность) дважды промывали ледяным PBS; солюбилизировали 400 мкл ледяного буфера RIPA, содержащего 24 ммоль/л трис-HCl (pH 7,6), 150 ммоль/л NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, полную мини-смесь ингибиторов протеаз (Roche) и PhosSTOP
10 (Roche); и замораживали на ночь при -80 °C. После размораживания образцы диспергировали на льду с помощью IKA Ultra-Turrax и центрифугировали при 14000 g и 4 °C в течение 5 мин. Супернатант переносили в новую реакционную пробирку и измеряли концентрацию белка с помощью анализа белка DC (Bio-Rad). Для протеомики 50 мкг белка обрабатывали с использованием электрофореза в ДСН-ПААГ
15 и гидролиза трипсином в геле, как описано ранее (Polten et al. Anal Chem. 2019;91:1302-1308). В частности, каждую дорожку геля разрезали на шесть фрагментов, которые отдельно подвергали гидролизу для получения шести пептидных образцов. Для фосфопротеомики использовали модифицированный протокол подготовки образца с фильтром (Nel et al. J Proteome Res. 2015;14:1637-1642). Вкратце, 300 мкг белка
20 объединяли с 200 мкл мочевинового буфера (8 моль/л мочевины, 0,1 моль/л трис-HCl [pH 9,5]) и загружали в 0,5-мл центробежный фильтр Amicon Ultra, 10 кДа (Merck). Фильтрующую мембрану дважды промывали 200 мкл мочевинового буфера, свободные остатки цистеина карбамидометилировали путем добавления 100 мкл 50 ммоль/л иодацетамида в мочевинном буфере в течение 20 мин в темноте. Затем фильтрующую
25 мембрану дважды промывали 100 мкл мочевинового буфера и дважды - 100 мкл 40 ммоль/л NH_4HCO_3 . Триптический гидролиз выполняли в 120 мкл 40 ммоль/л NH_4HCO_3 , содержащего 7 мкг трипсина для масс-спектрометрии (Serva). После гидролиза в течение ночи при 37 °C пептиды дважды элюировали 40 мкл 40 ммоль/л NH_4HCO_3 . Объединенную проточную фракцию подкисляли добавлением 12 мкл 10% трифторуксусной кислоты (ТФУК), а затем высушивали посредством
30 центрифугирования в вакууме. Фосфорилированные пептиды обогащали с использованием наборов Pierce Fe-NTA и Pierce TiO_2 для обогащения фосфопептидов от Thermo Scientific, следуя протоколам производителя. Вкратце, после уравнивания колонки Fe-NTA высушенные расщепленные пептиды растворяли в

200 мкл связывающего буфера, наносили на колонку и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После центрифугирования собирали проточную фракцию. После двух этапов промывки 100 мкл промывочного буфера А и двух стадий промывки 200 мкл промывочного буфера В проточную и промывочную фракции объединяли, 5 высушивали с помощью центрифугирования в вакууме и загружали на центрифужный наконечник TiO_2 для обогащения фосфопептидов. После промывки фосфопептиды, связанные с центрифужным наконечником, элюировали и высушивали с помощью центрифугирования в вакууме. Фосфопептиды, связанные с колонкой Fe-NTA, дважды элюировали 100 мкл элюирующего буфера. Фракции элюата объединяли и высушивали 10 с помощью центрифугирования в вакууме. Фосфопептидные элюаты, полученные на этапах обогащения на основе Fe-NTA и TiO_2 , обессоливали с использованием графитовых центрифужных колонок Pierce (Thermo Fisher).

Жидкостная хроматография - тандемная масс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС) и 15 *обработка данных.* Шесть пептидных и два фосфопептидных образца на повторность разводили в 30 мкл загрузочного буфера для высокоэффективной жидкостной хроматографии (2% ацетонитрила, 0,1% ТФУК) и отдельно анализировали с использованием системы UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific), соединенной с масс-спектрометром LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific), как описано ранее 20 (Junemann et al. Front Microbiol. 2018;9:3083). Полученные спектры анализировали с помощью программного обеспечения MaxQuant (версия 1.6.1.0), применяя встроенную пептидную поисковую систему Andromeda и базу знаний UniProt для крысы (Tyanova et al. Nat Protoc. 2016;11:2301-2319; UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Res. 2019;47:D506-D515). Пропионамидирование (C) (анализ 25 протеома) или карбамидометилирование (C) (анализ фосфопротеома) задавали в качестве фиксированных модификаций; фосфорилирование (S/T/Y), окисление (M), дезамидирование (N/Q) и N-концевое ацетилирование - в качестве переменных модификаций. Допускали длину пептидов выше шести аминокислот и до двух пропущенных событий гидролиза трипсином. Порог частоты ложного обнаружения 30 (FDR) задали равным 0,01 как на уровне пептида, так и на уровне белка, и применили алгоритм межсерийного совпадения. Потенциальные загрязнители и обратные попадания в базу данных исключали. Отсутствующие значения подставляли на основании нормального распределения всех измеренных $\log_2$ -трансформированных значений интенсивности с использованием программного обеспечения Perseus

(версия 1.6.1.3), применяя ширину 0,3 и сдвиг вниз 1,8 отдельно для каждой повторности (Tyanova et al. Nat Methods. 2016;13:731-740). Для анализа фосфопротеома рассматривали только сайты фосфорилирования с вероятностью локализации более 0,75. Сайты фосфорилирования, не поддающиеся обнаружению во всех
5 четырех повторностях по меньшей мере в одном экспериментальном состоянии, отфильтровывали. Интенсивность сайта фосфорилирования нормировали по количеству соответствующего белка. Анализ главных компонентов был основан на всех сайтах фосфорилирования со значениями $P < 0,05$, согласно расчетам ANOVA в Perseus. Кластеры в пространстве главных компонентов выделяли на основе линейной
10 регрессии значений для повторностей. Неконтролируемую иерархическую кластеризацию выполняли с помощью пакета ComplexHeatmap для R с использованием интенсивности участков фосфорилирования с поправкой на медиану и метрики евклидова расстояния для деревьев строк и столбцов (Gu et al. Bioinformatics. 2016;32:2847-2849). Для парных сравнений различия в интенсивности
15 фосфорилирования нормировали по соответствующим различиям в относительном содержании белка. Отсутствующие количественные значения в протеоме по меньшей мере при одном состоянии или незначимо регулируемый белок (значение $P > 0,05$ для двустороннего t -критерия для независимых выборок) считали коэффициентом относительного содержания белка, равным 1. Линейный анализ обогащения киназного
20 мотива выполняли с использованием Perseus и аннотаций сайта фосфорилирования из базы данных PhosphoSitePlus (Hornbeck et al. Nucleic Acids Res. 2015;43:D512-520; Hoglebe et al. Nat Commun. 2018;9:1045). Отношения киназа-субстрат спрогнозировали на основе мотива распознавания последовательностей вокруг измеренных сайтов фосфорилирования. Субстратные мотивы значимо регулируемых киназ сайтов
25 фосфорилирования категориально обогащали с помощью точного критерия Фишера. Для каждой значимо регулируемой киназы (Benjamini-Hochberg $FDR < 0,02$) выделяли все потенциальные мишени (положительный мотив распознавания киназы-субстрата, вероятность локализации $> 0,75$, значение $P > 0,05$ для двустороннего t -критерия для независимых выборок) и определяли среднеарифметическое значение регуляция
30 (Hoglebe 2018).

Анализ активности киназы PIM. Активность киназы PIM измеряли с помощью ферментативной системы киназы PIM и анализа киназы ADP-Glo (Promega, #V4032).

Измерение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . АМСМ высевали на покрытые ламином стеклянные покровные стекла в среде 199 с добавлением 5% FCS и 10 ммоль/л монооксима 2,3-бутандиона. Через 3 часа клетки переключали на среду 199, загружали 1,5 мкмоль/л fura-2, АМ (Invitrogen, # F1221) на 20 мин при 37 °С, дважды промывали в течение 15 мин и переносили в изготовленную на заказ перфузионную камеру. Клетки электрически стимулировали стимулятором MyoPacer EP (IonOptix) при постоянной рециркуляции раствора изотонического электролита, содержащего (в ммоль/л) NaCl - 117, KCl - 5,7, NaH_2PO_4 - 1,2, $CaCl_2$ - 1,25, $MgSO_4$ - 0,66, глюкозы - 10, пирувата натрия - 5, креатина - 10 и HEPES - 20 (pH 7,4) (Mutig et al. Mol Immunol. 2013;56:720-728). Палочкообразные покоящиеся кардиомиоциты с четко определенными связками, реагирующие на стимуляцию (1 Гц, 15 В, длительность импульса 4 мс), отбирали случайным образом. Импульсные сигналы Ca^{2+} в одиночных клетках регистрировали путем измерения флуоресценции, излучаемой при 510 нм после возбуждения чередующимися длинами волн 340 и 380 нм, с использованием системы на основе фотоумножителя флуоресценции с двойным возбуждением (IonOptix), как описано ранее (Mutig 2013; Dobson et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;295:H2364-2372). Среднюю фоновую флуоресценцию регистрировали отдельно в группе из 10 клеток, не нагруженных fura-2, АМ, и вычитали перед расчетом отношения флуоресценции при 340 нм/380 нм (R). Данные 20 импульсных сигналов кальция на клетку усредняли. Амплитуду отношения Fura-2, АМ, максимальную скорость Fura-2, увеличение отношения АМ и постоянную времени (τ) распада отношения Fura-2, АМ анализировали с использованием IonWizard 6.5.

Анализ сокращения и расслабления саркомеров в одиночной клетке. АМСМ высевали на покрытые ламином стеклянные покровные стекла в среде 199 с добавлением 5% FCS и 10 ммоль/л монооксима 2,3-бутандиона. Через 3 часа клетки переключали на среду 199, переносили в изготовленную на заказ перфузионную камеру и электрически стимулировали, как описано выше. Для каждой клетки определяли представляющую интерес прямоугольную область, включающую 15–20 саркомеров, и регистрировали изменения в длине саркомеров с помощью видеокамеры с ПЗС с переменной скоростью (MyoCam-S, IonOptix), подключенной к инвертированному микроскопу (Olympus IX71). Алгоритм быстрого преобразования Фурье (FFT) использовали для записи изменений длины саркомеров во время электрически стимулируемых сокращений. Данные 20–30 сокращений на клетку усредняли.

Амплитуду сокращения, максимальную скорость укорочения и максимальную скорость расслабления анализировали с помощью программного обеспечения IonWizard 6.5 (IonOptics).

5 *Образцы плазмы человека.* Образцы плазмы, обработанные ЭДТА, получили от 11 пациентов (возрастной диапазон 76–86 лет, 3 мужчины и 8 женщин) с эхокардиографическими признаками тяжелого стеноза аорты с высоким градиентом (площадь клапана $0,65 \pm 0,05$ см², средний градиент давления 51 ± 3 мм рт. ст.), которые должны были пройти плановую транскатетерную имплантацию аортального клапана (TAVI) в Медицинской школе Ганновера. Пациентов с ишемической болезнью сердца (стенозом любого просвета $>50\%$), активным воспалительным или злокачественным заболеванием, расчетной скоростью клубочковой фильтрации ниже 30 мл/мин/1,73 м² или признаками декомпенсации сердца исключали. Второй образец плазмы получали во время стандартного обследования в рамках последующего наблюдения через 3 месяца после TAVI. Кроме того, образцы плазмы с ЭДТА 10 получили от 13 предположительно здоровых людей (75–84 лет, 3 мужчин и 10 женщин), отобранных в Гейдельбергском университете (Giannitsis et al. Clin Biochem. 2020;78:18-24). Образцы плазмы хранили при температуре -80 °C. Все участники предоставили письменное информированное согласие, а местные комитеты по этике 15 одобрили исследование.

Статистический анализ. Однопометных мышей случайным образом распределили в различные экспериментальные группы. На основании визуального осмотра данные, как правило, распределяли с аналогичными значениями дисперсии в 25 различных группах. При небольших размерах выборки мы не применяли статистические критерии на нормальность или равенство дисперсий. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ s.e.m., если не указано иное. *T*-критерий для 2 независимых выборок использовали для сравнения 2 групп. Для сравнения между более чем 2 группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) 30 при наличии 1 независимой переменной, и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) при наличии 2 независимых переменных. Апостериорный критерий Даннетта использовали для множественных сравнений с одной контрольной группой. Апостериорный критерий Тьюки использовали для поправки на множественные сравнения. Считали, что 2-стороннее значение *P* менее 0,05 указывает на

статистическую значимость. К.С.W. имел полный доступ ко всем данным в исследовании и несет ответственность за целостность данных и анализ данных.

Пример 1:

5 Белок MYDGF (фактор 1 человека; C19orf10) выявляли, как подробно описано в WO 2014/111458. Нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор 1 человека, доступна в NCBI под Gene ID: 56005 (SEQ ID NO: 6). Аминокислотная последовательность фактора 1 человека, включая N-концевой сигнальный пептид, подробно описана в SEQ ID NO: 3. В примерах применяли MYDGF человека без
10 сигнального пептида и экспрессировали, как подробно описано в Ebenhoch R. et al., Crystal structure and receptor-interacting residues of MYDGF - a protein mediating ischemic tissue repair (Nat Commun. 2019 Nov 26;10(1):5379 и Polten et al. Plasma Concentrations of Myeloid-Derived Growth Factor in Healthy Individuals and Patients with Acute Myocardial Infarction as Assessed by Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry. Anal Chem.
15 2019 Jan 15;91(2):1302-1308).

Гомолог MYDGF человека у мыши, используемый в примерах:

Сегмент ДНК Mus musculus, 17 хромосома, Университет штата Уэйн 104, экспрессированный (D17Wsu104e). Нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор 1 мыши, доступна в NCBI под Reference Sequence: NM_080837.2 (SEQ ID NO:
20 7). Аминокислотная последовательность фактора 1 мыши, включая N-концевой сигнальный пептид, подробно описана в SEQ ID NO: 4. Поскольку N-концевой сигнальный пептид не несет соответствующей биологической функции, в настоящем изобретении использовали Mydgm мыши без N-концевого пептида согласно SEQ ID NO: 2. С этой целью последовательность кДНК Mydgm мыши (содержащую эндогенный N-
25 концевой сигнальный пептид и C-концевой 6х His-маркер) клонировали в плазмидный вектор pFlpBtM-II и экспрессировали в клетках HEK 293-6E (Meyer S, et al. Multi-host expression system for recombinant production of challenging proteins. PLoS One. 2013;8:e68674). Mydgm мыши, не содержащий сигнального пептида, очищали от кондиционированного клеточного супернатанта с помощью аффинной хроматографии
30 и эксклюзионной хроматографии. Для очистки рекомбинантного Mydgm к белку добавляли 6хHis-маркер.

Сравнение последовательностей MYDGF человека (SEQ ID NO: 1) и Mydgm мыши (SEQ ID NO: 2) выявило 92% идентичность последовательностей между обеими аминокислотными последовательностями.

Пример 2:

5 Фактор роста миелоидного происхождения человека и мыши ингибирует гипертрофию (конечный показатель - площадь клетки) миоцитов желудочка новорожденной крысы (NRVM), стимулированных эндотелином 1 (ET1), в зависимости от дозы. NRVM стимулировали в течение 24 часов 100 нмоль/л ET1 (здесь и ниже - приобретенного в Sigma-Aldrich) и/или рекомбинантным фактором

10 роста миелоидного происхождения мыши или человека, соответственно (здесь и ниже MydGF продуцировали в клетках HEK 293 / MYDGF продуцировали в клетках HEK 293, как описано в Ebenhoch R. et al., Crystal structure and receptor-interacting residues of MYDGF - a protein mediating ischemic tissue repair. Nat Commun. 2019 Nov 26;10(1):5379 и Polten F. et al. Plasma Concentrations of Myeloid-Derived Growth Factor in Healthy

15 Individuals and Patients with Acute Myocardial Infarction as Assessed by Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry. Anal Chem. 2019 Jan 15;91(2):1302-1308, здесь и далее). ET1 представляет собой пептидный гормон и классический индуктор гипертрофии кардиомиоцитов in vitro и in vivo (см. обзор в Heineke J & Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:589-

20 600). Гипертрофию кардиомиоцитов определяли посредством планиметрии (конечный показатель - площадь клетки). Результаты показаны ниже в таблице 2.

Таблица 2: Площадь клеток NRVM, культивируемых в отсутствие (контроль) или в присутствии ET1 и/или MydGF или MYDGF, соответственно

	Количество независимых экспериментов	Площадь клетки Среднее $\pm$ SEM (% от контроля)	Значение Р
Контроль	6	100 $\pm$ 4	
MydGF (100 нг/мл)	6	107 $\pm$ 3	
ET1	9	160 $\pm$ 4	<0,001 по сравнению с контролем
ET1 + MydGF (3 нг/мл)	6	147 $\pm$ 3	
ET1 + MydGF (10 нг/мл)	5	124 $\pm$ 3	<0,01 по сравнению с ET1
ET1 + MydGF (30 нг/мл)	6	119 $\pm$ 4	<0,001 по сравнению с ET1
ET1 + MydGF (100 нг/мл)	9	116 $\pm$ 1	<0,001 по сравнению с ET1

ET1 + MydGF (300 нг/мл)	6	116 ± 2	<0,001 по сравнению с ET1
Контроль	4	100 ± 2	
MYDGF (100 нг/мл)	4	102 ± 3	
ET1	4	141 ± 2	<0,001 по сравнению с контролем
ET1 + MYDGF (3 нг/мл)	4	134 ± 1	
ET1 + MYDGF (10 нг/мл)	4	121 ± 1	<0,05 по сравнению с ET1
ET1 + MYDGF (30 нг/мл)	4	116 ± 1	<0,01 по сравнению с ET1
ET1 + MYDGF (100 нг/мл)	4	111 ± 2	<0,001 по сравнению с ET1
ET1 + MYDGF (300 нг/мл)	4	117 ± 2	<0,01 по сравнению с ET1

Пример 3:

Фактор роста миелоидного происхождения человека и мыши ингибирует гипертрофию (конечный показатель - содержание белка) миоцитов желудочка новорожденной крысы (NRVM), стимулированных эндотелином 1 (ET1). NRVM стимулировали в течение 24 часов 100 нмоль/л ET1 и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши или человека, соответственно (т.е. MydGF или MYDGF, соответственно). Результаты показаны ниже в таблице 3.

10 **Таблица 3: Содержание белка в NRVM, культивируемых в отсутствие (контроль) или в присутствии ET1 и/или MydGF или MYDGF, соответственно**

	Количество независимых экспериментов	Содержание белка Среднее ± SEM (% от контроля)	Значение Р
Контроль	3	100 ± 5	
MydGF	3	78 ± 8	
ET1	3	165 ± 5	<0,001 по сравнению с контролем
ET1 + MydGF	3	104 ± 2	<0,01 по сравнению с ET1
Контроль	6	100 ± 7	
MYDGF	6	111 ± 7	
ET1	6	194 ± 13	<0,001 по сравнению с контролем

ET1 + MYDGF	6	136 ± 7	<0,01 по сравнению с ET1
-------------	---	---------	--------------------------

Пример 4:

Фактор роста миелоидного происхождения мышцы ингибирует гипертрофию (конечный показатель - размер клетки) миоцитов желудочка взрослой крысы (ARVM), стимулированных эндотелином 1 (ET1). ARVM стимулировали в течение 24 часов 100 нмоль/л ET1 и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мышцы (т.е. Mydgf). Гипертрофию кардиомиоцитов определяли с помощью морфометрии (длина и ширина клеток) и планиметрии (площадь клеток). Результаты показаны ниже в таблице 4.

Таблица 4: Размер клеток ARVM, культивируемых в отсутствие (контроль) или в присутствии ET1 и/или Mydgf

	Количество независимых экспериментов	Среднее ± SEM	Значение Р
Площадь клетки (мкм²)			
Контроль	3	1838 ± 55	
Mydgf	3	1711 ± 71	
ET1	3	2285 ± 64	<0,01 по сравнению с контролем
ET1 + Mydgf	3	1821 ± 39	<0,01 по сравнению с ET1
Длина клетки (мкм)			
Контроль	3	120 ± 2	
Mydgf	3	124 ± 2	
ET1	3	124 ± 2	
ET1 + Mydgf	3	120 ± 1	
Ширина клетки (мкм)			
Контроль	3	18 ± 1	
Mydgf	3	15 ± 1	
ET1	3	23 ± 1	<0,05 по сравнению с контролем
ET1 + Mydgf	3	17 ± 1	<0,05 по сравнению с ET1

Пример 5:

Фактор роста миелоидного происхождения мышцы повышает экспрессию белка Ca²⁺-АТФазы (Serca2a) в миоцитах желудочка новорожденной крысы (NRVM),

стимулированных эндотелином 1 (ET1). NRVM стимулировали в течение 24 часов 100 нмоль/л ET1 и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (т.е. Mydgf). Затем определяли уровни экспрессии белка Serca2a и винкулина с помощью иммуноблоттинга. Serca2a является критическим регулятором гомеостаза кальция в кардиомиоцитах. В экспериментальных моделях сердечной недостаточности и при сердечной недостаточности человека экспрессия Serca2a (SERCA2a у человека) в кардиомиоцитах снижается, что способствует снижению функции и сердечной недостаточности. Таким образом, SERCA2a предложен в качестве мишени для лечения сердечной недостаточности (см. обзор в Kawase Y & Hajjar RJ. The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2008;5:554-65). Результаты показаны ниже в таблице 5.

Таблица 5: Экспрессия белка Serca2a (нормированная по экспрессии белка винкулина) в NRVM, культивируемых в отсутствие (контроль) или в присутствии ET1 и/или Mydgf

	Количество независимых экспериментов	Экспрессия белка Serca2a Среднее $\pm$ SEM (% от контроля)	Значение Р
Контроль	6	100 $\pm$ 6	
Mydgf	6	137 $\pm$ 10	<0,05 по сравнению с контролем
ET1	6	96 $\pm$ 6	
ET1 + Mydgf	6	131 $\pm$ 8	<0,05 по сравнению с ET1

Пример 6:

Снижение экспрессии Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (Serca2a) устраняет антигипертрофическое действие фактора роста миелоидного происхождения мыши в миоцитах желудочка новорожденной крысы (NRVM), стимулированных эндотелином 1 (ET1). NRVM трансфицировали малой интерферирующей (ми)РНК, мишенью которой являлся Serca2a (приобретенной в Thermo Fisher Scientific, № в каталоге 4390771, ID: s132037) или контрольной миРНК (Thermo Fisher Scientific, № в каталоге 4390843). После этого NRVM стимулировали в течение 24 часов 100 нмоль/л ET1 и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (т.е.). Гипертрофию кардиомиоцитов определяли посредством планиметрии (конечный показатель - площадь клетки). Результаты показаны ниже в таблице 6.

Таблица 6: Размер клеток NRVM, культивируемых в отсутствие (контроль) или в присутствии ET1 и/или MydGF после трансфекции miРНК Serca2a или контрольной miРНК

	Количество независимых экспериментов	Площадь клетки Среднее $\pm$ SEM (мкм ²)	Значение Р
Предварительная обработка контрольной miРНК			
Контроль (без стимуляции)	3	857 $\pm$ 10	
MydGF	3	799 $\pm$ 90	
ET1	3	1371 $\pm$ 69	<0,01 по сравнению с отсутствием стимуляции
ET1 + MydGF	3	944 $\pm$ 63	<0,01 по сравнению с ET1
Предварительная обработка miРНК Serca2a			
Контроль (без стимуляции)	3	951 $\pm$ 37	
MydGF	3	980 $\pm$ 47	
ET1	3	1307 $\pm$ 36	<0,001 по сравнению с отсутствием стимуляции
ET1 + MydGF	3	1265 $\pm$ 37	Незначимо по сравнению с ET1

5 Пример 7:

Фактор роста миелоидного происхождения мыши способствует антифиброзным эффектам (конечные показатели - экспрессия коллагена 1A1 и мРНК фактора роста соединительной ткани [Tgf β 1]) в фибробластах, стимулированных трансформирующим фактором роста β 1 (Tgf β 1), выделенных из желудочков новорожденной крысы (NRVF). NRVF стимулировали в течение 24 часов рекомбинантным Tgf β 1 мыши (2 нг/мл; здесь и ниже - приобретенным в R&D Systems) и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (MydGF). TGF β 1 является критическим индуктором фиброза органов (см. обзор в Border WA & Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. N Engl J Med 1994;331:1286-92). Результаты показаны ниже в таблице 7.

Таблица 7: Экспрессия мРНК коллагена 1A1 и Ctgf (OT-кПЦР) в NRVF, культивируемых в отсутствие (контроль) или в присутствии Tgf β 1 и/или MydGF

	Количество независимых экспериментов	Среднее $\pm$ SEM	Значение Р
Экспрессия коллагена 1A1 (% от контроля)			
Контроль	3	100 $\pm$ 17	
MydGF	3	125 $\pm$ 34	

Tgfβ1	3	252 ± 16	<0,01 по сравнению с контролем
Tgfβ1 + Mydgf	3	148 ± 18	<0,05 по сравнению с Tgfβ1
Экспрессия CTGF (% от контроля)			
Контроль	3	100 ± 28	
Mydgf	3	147 ± 38	
Tgfβ1	3	235 ± 18	<0,05 по сравнению с контролем
Tgfβ1 + Mydgf	3	81 ± 39	<0,05 по сравнению с Tgfβ1

Пример 8:

Фактор роста миелоидного происхождения мышцы способствует антифиброзным эффектам (конечный показатель - активность промотора α-актина гладких мышц [SMA]) в фибробластах, стимулированных трансформирующим фактором роста β1 (Tgf β1), выделенных из желудочков новорожденной крысы (NRVF). NRVF трансфицировали репортерной плазмидой, кодирующей люциферазу светляка, под контролем фрагмента промотора αSMA человека (-259/+51 пар оснований), а затем стимулировали в течение 24 часов рекомбинантным Tgfβ 1 мышцы (2 нг/мл) и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мышцы (Mydgf). Результаты показаны ниже в таблице 8.

Таблица 8: αАктивность промотора SMA в NRVF, культивируемых в отсутствие (контроль) или в присутствии Tgfβ1 и/или Mydgf

	Количество независимых экспериментов	αАктивность промотора SMA Среднее ± SEM (% от контроля)	Значение Р
Контроль	8	100 ± 19	
Mydgf	8	133 ± 18	
Tgfβ1	8	712 ± 32	<0,001 по сравнению с контролем
Tgfβ1 + Mydgf	8	467 ± 42	<0,001 по сравнению с Tgfβ1

Пример 9:

Фактор роста миелоидного происхождения человека частично ослабляет индуцированные трансформирующим фактором роста β1 (Tgf β1) изменения

экспрессии генов в фибробластах, выделенных из желудочка новорожденной крысы (NRVF). NRVF совместно инкубировали с рекомбинантным Tgfβ 1 мыши (2 нг/мл) и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения человека (MYDGF) в течение 4 часов. РНК PolyA выделяли, преобразовывали в кДНК и подвергали подготовке библиотек перед профилированием экспрессии генов с использованием высокопроизводительного секвенирования. Прочтения выравнивали с эталонным геномом крысы, подсчитывали количество прочтений, сопоставленных с каждым геном, и рассчитывали дифференциальный ген (указанный в таблице 9) в различных условиях лечения с помощью пакета Bioconductor limma, с применением скорректированного порогового значения p 0,1 и порогового значения кратности изменения 1,526 генов, экспрессия которых подавляется Tgfβ 1, стимулировались за счет MYDGF, и 30 генов, индуцируемых Tgfβ 1, подавлялись за счет MYDGF.

Таблица 9:

Ensembl no.	Entrez no.	Условное обозначение	TGfβ 1 по сравнению с контролем			MYDGF+TGfβ 1 по сравнению с TGfβ 1		
			log2-кратное изменение	значение p	скорректированное значение p	log2-кратное изменение	значение p	скорректированное значение p
ENSRNOG000000010047	140582	Ddit4l	-2,812761867	3,77E-12	1,45E-10	1,52600617	0,000426049	0,021683208
ENSRNOG0000000025624	367085	Arhgap20	-2,923396234	3,37E-38	7,86E-36	1,435616525	1,40E-09	4,21E-07
ENSRNOG0000000029768	287562	Ccl12	-2,083108672	2,29E-08	5,46E-07	1,246021285	0,001052384	0,046452616
ENSRNOG0000000037082	310782	Mybphl	-1,609166645	1,44E-15	7,69E-14	1,129579176	5,65E-08	1,15E-05
ENSRNOG0000000002771	59325	Ereg	-1,833195893	7,96E-11	2,65E-09	1,076789668	0,000232694	0,013273145
ENSRNOG0000000010308	113984	Nr2f2	-1,442120196	6,38E-46	2,18E-43	1,000033277	1,48E-22	3,11E-19
ENSRNOG0000000006569	362800	Itgb8	-1,032689837	1,25E-05	0,000186492	0,975203941	3,66E-05	0,00291766
ENSRNOG0000000057794	304135	Adams5	-1,762562535	3,54E-25	4,39E-23	0,898314638	1,57E-07	2,70E-05
ENSRNOG0000000032396	287231	RGD1559575	-0,792009963	0,007679422	0,049138468	0,867724628	0,003041748	0,098388569
ENSRNOG0000000004033	361324	Sema6a	-1,823280646	4,07E-19	3,09E-17	0,812021871	9,84E-05	0,00654701
ENSRNOG0000000020904	309175	Cdc42ep2	-1,473108316	3,94E-34	8,24E-32	0,751091175	1,77E-09	5,09E-07
ENSRNOG0000000008336	25341	Tnfrsf11b	-1,644928606	5,67E-191	3,97E-187	0,747009664	3,18E-40	2,00E-36
ENSRNOG0000000002381	25667	Bmp3	-1,583132157	8,05E-32	1,54E-29	0,745213673	6,76E-08	1,31E-05
ENSRNOG0000000006019	289388	G0s2	-1,674729992	1,05E-13	4,74E-12	0,741857524	0,001659897	0,064671706
ENSRNOG0000000009482	499380	Emx2	-1,08642493	6,47E-08	1,44E-06	0,721127386	0,000427459	0,021683208
ENSRNOG0000000011136	315039	Osr2	-0,735320588	0,000634476	0,006077244	0,700279447	0,001100292	0,048389741
ENSRNOG0000000013306	306081	Pcdh20	-0,817305837	1,59E-12	6,29E-11	0,693908597	2,15E-09	5,75E-07
ENSRNOG0000000047699	25554	Snai2	-0,736414335	1,05E-23	1,13E-21	0,682561737	1,17E-20	1,84E-17
ENSRNOG0000000004317	29555	Vipr2	-1,297086252	5,09E-29	8,58E-27	0,680780156	1,41E-08	3,23E-06
ENSRNOG0000000000906	360757	Medag	-2,035407803	1,60E-48	6,59E-46	0,672788094	7,25E-06	0,000765992
ENSRNOG0000000003317183	317183	Pcdh19	-1,348884511	1,84E-21	1,76E-19	0,63758932	1,09E-05	0,001066687

929						3		
ENSRNOG00000008785	84410	Klf5	-0,827267237	2,27E-07	4,62E-06	0,635712124	8,32E-05	0,005750261
ENSRNOG000000020546	25330	Lipe	-1,114731561	2,48E-10	7,81E-09	0,635532422	0,000517103	0,02561083
ENSRNOG000000027030	25026	Adm	-1,155301212	9,62E-37	2,10E-34	0,634092879	7,06E-12	3,29E-09
ENSRNOG000000026607	NA	Tnfsf18	-1,818921178	6,28E-59	3,99E-56	0,62533476	3,25E-08	6,94E-06
ENSRNOG000000014874	305454	Zfyve28	-1,694362265	3,00E-28	4,48E-26	0,619012229	0,000113017	0,0073666
ENSRNOG000000018858	292264	Myct1	1,630038156	3,74E-28	5,50E-26	0,615641506	7,68E-07	0,000109569
ENSRNOG000000060773	360899	Sertad4	1,061766796	2,95E-46	1,03E-43	0,64373987	2,09E-18	2,92E-15
ENSRNOG000000058329	113931	Prrx2	0,739261343	1,08E-06	1,97E-05	0,665650907	8,52E-06	0,000878751
ENSRNOG000000052486	64358	Kcna6	1,554760933	1,26E-33	2,51E-31	0,670163862	1,98E-08	4,37E-06
ENSRNOG000000015441	25084	Il4r	1,102247467	1,31E-65	1,23E-62	0,672879612	6,88E-27	1,73E-23
ENSRNOG000000019390	316088	Klhl40	2,451156465	3,84E-25	4,72E-23	0,678477305	2,47E-05	0,002044872
ENSRNOG000000001979	266766	Rcan1	1,253706503	5,05E-27	7,00E-25	0,67924198	3,18E-09	8,34E-07
ENSRNOG000000042838	24517	Junb	0,706774333	1,59E-13	7,01E-12	0,693007988	4,15E-13	2,27E-10
ENSRNOG000000000827	294235	Ier3	0,976232517	3,11E-15	1,62E-13	0,699701738	1,37E-08	3,19E-06
ENSRNOG000000053113	NA	Rn50_1_0435.2	1,775351734	1,36E-15	7,34E-14	0,716243601	0,000328525	0,01729223
ENSRNOG000000000156	65049	LOC100911486	2,121240906	5,64E-19	4,18E-17	0,720265885	0,000355969	0,018658692
ENSRNOG000000013683	29733	S1pr1	1,182602471	3,05E-16	1,72E-14	0,728559362	4,41E-08	9,24E-06
ENSRNOG000000014197	500578	Tmem51	1,018751726	2,04E-15	1,08E-13	0,730126734	6,76E-09	1,64E-06
ENSRNOG000000002227	64030	Kit	1,77921558	2,51E-27	3,51E-25	0,737695719	1,55E-07	2,70E-05
ENSRNOG000000013166	84426	Wnt4	1,914205655	8,00E-52	4,00E-49	0,740049809	1,11E-09	3,48E-07
ENSRNOG000000002072	360695	Eva1c	0,831960971	6,06E-05	0,000778634	0,745330988	0,000238057	0,013369425
ENSRNOG000000007159	24770	Ccl2	1,243501309	1,96E-16	1,13E-14	0,756950717	4,72E-07	6,99E-05
ENSRNOG000000000034	289419	Nuak2	1,069346085	1,56E-21	1,51E-19	0,786139167	7,92E-13	4,15E-10
ENSRNOG000000007118	500221	Eva1a	1,414031637	6,16E-12	2,32E-10	0,802408121	2,72E-05	0,002220679
ENSRNOG000000007637	313339	Acer2	1,001219486	1,46E-07	3,05E-06	0,80911866	1,00E-05	0,001006667
ENSRNOG000000008323	287467	Pitpnm3	1,58842341	5,87E-14	2,73E-12	0,813876235	1,64E-05	0,001477074
ENSRNOG000000018003	116677	F2rl1	1,089740553	0,000129571	0,001531432	0,842431516	0,001785917	0,068081333
ENSRNOG000000007002	60584	LIF	1,631933844	2,85E-40	7,26E-38	0,857505491	3,48E-15	2,92E-12
ENSRNOG000000000640	114090	Egr2	1,915116308	7,82E-28	1,12E-25	-0,8827439	1,46E-08	3,29E-06

ENSRNOG00000056 219	140914	Olr1	2,35531464	4,69E-234	6,56E-230	- 0,88597617 6	1,30E-35	5,44E-32
ENSRNOG00000013 515	116680	Ptpru	1,413511763	1,12E-06	2,04E-05	- 0,90595175 4	0,0009691 9	0,043700407
ENSRNOG00000005 332	266600	Csdc2	1,468181877	9,18E-12	3,43E-10	- 0,91518546 3	4,57E-06	0,00050899
ENSRNOG00000007 687	315711	Sema7a	1,757693473	5,81E-29	9,56E-27	- 0,94408095 3	2,40E-11	1,04E-08
ENSRNOG00000043 098	689415	Mt2A	1,131345161	0,0001107 91	0,001335405	- 1,33974247 1	5,34E-06	0,000573766
ENSRNOG00000038 047	24567	Mt1	1,771916419	8,31E-06	0,000128422	- 1,95106387	1,13E-06	0,000150773

Пример 10:

Терапия белком фактора роста миелоидного происхождения мыши способствует антигипертрофическим и антифиброзным эффектам у мышей, подвергнутых поперечному сужению аорты (ТАС). Мышам C57BL6/N дикого типа выполняли операцию ТАС (впервые описанную в Rockman HA et al. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo mouse model of cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:8277-81).. ТАС подвергает левый желудочек сердца хронической перегрузке давлением и приводит к гипертрофии и интерстициальному фиброзу левого желудочка (ЛЖ) (см. обзор в Houser SR et al. Animal models of heart failure: A scientific statement from the American Heart Association. Circ Res 2012;111:131-50). Контрольным мышам выполняли имитационную операцию (торакотомия без сужения аорты). Сразу после ТАС мышам вводили 10 мкг рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (Mydgif) путем внутрибрюшинной болюсной инъекции. После этого мышам вводили Mydgif путем подкожного вливания в течение 7 суток (10 мкг/сут с помощью осмотических мини-насосов). Дополнительным мышам с ТАС вводили только носитель (0,9% NaCl) путем инъекции и вливания. Через 42 суток определяли гипертрофию ЛЖ с помощью гравиметрии (конечный показатель - масса ЛЖ/масса тела с использованием стандартных весов, доступных для приобретения); интерстициальный фиброз ЛЖ количественно определяли с помощью окрашивания Sirius red. Результаты показаны ниже в таблице 10.

Таблица 10: Гипертрофия и интерстициальный фиброз ЛЖ после имитационной операции или ТАС

	Количество мышей	Среднее $\pm$ SEM	Значение P
Масса ЛЖ/масса тела (мг/г)			

Имитационная операция	5	$4,9 \pm 0,3$	
TAC, NaCl	7	$9,0 \pm 0,7$	<0,001 по сравнению с имитационной операцией
TAC, Mydgg	7	$6,9 \pm 0,3$	<0,05 по сравнению с TAC, NaCl
Интерстициальный фиброз ЛЖ (% от имитационной операции)			
Имитационная операция	5	100 ± 2	
TAC, NaCl	7	315 ± 9	<0,001 по сравнению с имитационной операцией
TAC, Mydgg	7	183 ± 9	<0,001 по сравнению с TAC, NaCl

Пример 11:

Терапия белком фактора роста миелоидного происхождения мыши улучшает функцию сердца у мышей, подвергнутых поперечному сужению аорты (TAC). Мышам C57BL/6/N дикого типа выполняли операцию TAC. Контрольным мышам выполняли имитационную операцию (торакалотию без сужения аорты). Сразу после TAC мышам вводили 10 мкг рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (Mydgg) путем внутрибрюшинной болюсной инъекции. После этого мышам вводили Mydgg путем подкожного вливания в течение 7 суток (10 мкг/сут с помощью осмотических мини-насосов). Дополнительным мышам с TAC вводили только носитель (0,9% NaCl) путем инъекции и вливания. Через 42 суток мышам выполняли двумерную трансторакальную эхокардиографию с высоким разрешением с использованием линейного датчика 30 МГц (VEVO 3100, VisualSonics). Конечно-диастолическую площадь левого желудочка (LVEDA) и конечно-систолическую площадь левого желудочка (LVESA) определяли в проекции длинной оси. Фракционное изменение площади (FAC) рассчитывали как меру систолической функции $[(LVEDA - LVESA) / LVEDA] \times 100$. Результаты показаны ниже в таблице 11.

Таблица 11: Размеры и систолическая функция ЛЖ после имитационной операции или TAC

	Количество мышей	Среднее $\pm$ SEM	Значение P
LVEDA (мм ²)			
Имитационная операция	10	$23,2 \pm 0,4$	
TAC, NaCl	6	$34,2 \pm 2,3$	<0,01 по сравнению с имитационной операцией
TAC, Mydgg	9	$29,2 \pm 1,5$	

LVESA (мм ²)			
Имитационная операция	10	12,1 ± 0,2	
TAC, NaCl	6	32,1 ± 2,5	<0,001 по сравнению с имитационной операцией
TAC, Mydgf	9	23,1 ± 1,8	<0,05 по сравнению с TAC, NaCl
FAC (%)			
Имитационная операция	10	48 ± 1	
TAC, NaCl	6	6 ± 1	<0,001 по сравнению с имитационной операцией
TAC, Mydgf	9	18 ± 3	<0,01 по сравнению с TAC, NaCl

Пример 12:

Терапия белком фактора роста миелоидного происхождения мыши усиливает экспрессию белка Ca²⁺-АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (Serca2a) в кардиомиоцитах левого желудочка, выделенных у мышей, подвергнутых поперечному сужению аорты (ТАС). Мышам C57BL6/N дикого типа выполняли операцию ТАС. Контрольным мышам выполняли имитационную операцию (торакотомия без сужения аорты). Сразу после ТАС мышам вводили 10 мкг рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (Mydgf) путем внутрибрюшинной болюсной инъекции. После этого мышам вводили Mydgf путем подкожного вливания в течение 7 суток (10 мкг/сут с помощью осмотических мини-насосов). Дополнительным мышам с ТАС вводили только носитель (0,9% NaCl) путем инъекции и вливания. Через 7 суток в выделенных кардиомиоцитах левого желудочка измеряли уровни экспрессии белка Serca2a и β-актина с помощью иммуоблоттинга. Результаты показаны ниже в таблице 12.

Таблица 12: Экспрессия белка Serca2a (нормированная по экспрессии белка β-актина) в кардиомиоцитах левого желудочка после имитационной операции или ТАС

	Количество мышей	Экспрессия Serca2a Среднее ± SEM (% от контроля)	Значение P
Имитационная операция	4	100 ± 9	
TAC, NaCl	5	61 ± 13	<0,05 по сравнению с имитационной операцией
TAC, Mydgf	5	107 ± 15	<0,05 по сравнению с TAC, NaCl

Пример 13:

Терапия белком фактора роста миелоидного происхождения мышцы снижает гипертрофию кардиомиоцитов левого желудочка у мышей, подвергнутых поперечному сужению аорты (ТАС). Мышам C57BL6/N дикого типа выполняли операцию ТАС.

- 5 Контрольным мышам выполняли имитационную операцию (торакотомия без сужения аорты). Сразу после ТАС мышам вводили 10 мкг рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мышцы (Mydgm) путем внутрибрюшинной болюсной инъекции. После этого мышам вводили Mydgm путем подкожного вливания в течение 7 суток (10 мкг/сут с помощью осмотических мини-насосов). Дополнительным мышам с
- 10 ТАС вводили только носитель (0,9% NaCl) путем инъекции и вливания. Через 42 суток определяли площадь поперечного сечения кардиомиоцитов левого желудочка в срезах ткани, окрашенных агглютинином зародыша пшеницы. Результаты показаны ниже в таблице 13.

15 *Таблица 13: Площадь поперечного сечения кардиомиоцитов после ТАС*

	Количество мышей	Среднее $\pm$ SEM (мкм ²)	Значение Р
ТАС, NaCl	6	653 $\pm$ 27	
ТАС, Mydgm	6	527 $\pm$ 26	<0,01 по сравнению с ТАС, NaCl

Пример 14:

Генная терапия на основе фактора роста миелоидного происхождения мышцы улучшает функцию сердца и стимулирует антигипертрофические и антифибротические эффекты у мышей, подвергнутых поперечному сужению аорты (ТАС). Мышей C57BL6/N дикого типа летально облучали и подвергали трансплантации стволовыми клетками костного мозга, трансдуцированными лентивирусом, кодирующим фактор роста миелоидного происхождения мышцы (Mydgm), или лентивирусом, кодирующим зеленый флуоресцентный белок (контроль GFP). Эта лентивирусная система была

25 описана ранее (Magnusson M et al. HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. Blood 2007;109:3687-96). Через 6 недель после трансплантации мышам выполняли операцию ТАС. Контрольным мышам выполняли имитационную операцию (торакотомия без сужения аорты). Через 42 суток мышам выполняли двумерную трансторакальную эхокардиографию с высоким разрешением с использованием линейного датчика 30 МГц (VEVO 3100, VisualSonics).

30

Конечно-диастолическую площадь левого желудочка (LVEDA) и конечно-систолическую площадь левого желудочка (LVESA) определяли в проекции длинной оси. Фракционное изменение площади (FAC) рассчитывали как меру систолической функции $[(LVEDA - LVESA) / LVEDA] \times 100$. В качестве показателя гипертрофии левого желудочка определяли толщину задней стенки левого желудочка по короткой оси. Интерстициальный фиброз ЛЖ количественно определяли с помощью окрашивания Sirius red. Результаты показаны ниже в таблице 14.

Таблица 14: Систолическая функция, гипертрофия и интерстициальный фиброз ЛЖ после имитационной операции или TAC

	Количество мышей	Среднее $\pm$ SEM	Значение P
FAC (%)			
Имитационная операция	10	53 ± 2	
TAC, контрольный лентивирус с GFP	6	13 ± 3	<0,001 по сравнению с имитационной операцией
TAC, лентивирус с MYDGF	6	33 ± 5	<0,01 по сравнению с TAC, контроль GFP
Толщина стенки левого желудочка (мм)			
Имитационная операция	10	$0,5 \pm 0,02$	
TAC, контрольный лентивирус с GFP	6	$1,0 \pm 0,03$	<0,001 по сравнению с имитационной операцией
TAC, лентивирус с MYDGF	6	$0,8 \pm 0,04$	<0,001 по сравнению с TAC, контроль GFP
Интерстициальный фиброз ЛЖ (% от имитационной операции)			
Имитационная операция	3	100 ± 47	
TAC, контрольный лентивирус с GFP	13	976 ± 159	<0,05 по сравнению с имитационной операцией
TAC, лентивирус с MYDGF	15	510 ± 148	<0,05 по сравнению с TAC, контроль GFP

Пример 15:

Фактор роста миелоидного происхождения человека ингибирует фосфорилирование SMAD, стимулированное трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) в фибробластах легких пациентов с идиопатическим легочным фиброзом. Фибробласты легких двух пациентов с идиопатическим легочным фиброзом стимулировали в течение 15, 30 или 60 минут 2 нг/мл рекомбинантного TGF $\beta 1$ человека (здесь и ниже - приобретенного в R&D Systems) в отсутствие или в присутствии 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения человека (MYDGF; здесь и далее - продуцируемого в клетках HEK 293).

Фосфорилирование (активацию) SMAD определяли с помощью иммуноблоттинга. Сигнальный путь SMAD является критическим медиатором профиброзных эффектов TGFβ1 (см. обзор в Walton KL et al. Targeting TGFβ mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. Front Pharmacol 2017;8:461). Результаты показаны ниже в таблице

5 15.

Таблица 15: Фосфорилирование SMAD2 (Ser465/467) и SMAD3 (Ser423/425) (нормированное по экспрессии α-тубулина) в фибробластах легких двух пациентов с идиопатическим легочным фиброзом, культивируемых в
отсутствии (контроль) или в присутствии TGFβ1 и/или MYDGF

10

	Фосфо-SMAD2 (% от контроля)	Фосфо-SMAD3 (% от контроля)
Фосфорилирование SMAD2/3 (% от контроля), пациент №1		
Контроль	100	100
MYDGF	166	113
TGFβ1 (15 мин)	717	1849
TGFβ1 (30 мин)	1128	1788
TGFβ1 (60 мин)	1223	1564
TGFβ1 + MYDGF (15 мин)	592	895
TGFβ1 + MYDGF (30 мин)	991	1509
TGFβ1 + MYDGF (60 мин)	609	1116
Фосфорилирование SMAD2/3 (% от контроля), пациент №2		
Контроль	100	100
MYDGF	79	88
TGFβ1 (15 мин)	2094	979
TGFβ1 (30 мин)	2201	1302
TGFβ1 (60 мин)	2044	724
TGFβ1 + MYDGF (15 мин)	309	919
TGFβ1 + MYDGF (30 мин)	354	807
TGFβ1 + MYDGF (60 мин)	35	496

Пример 16:

Фактор роста миелоидного происхождения человека ингибирует миграцию фибробластов легких пациентов с идиопатическим легочным фиброзом. Фибробласты легких двух пациентов с идиопатическим легочным фиброзом культивировали до достижения конfluence. Монослой царапали 200-мкл наконечником пипетки, промывали и культивировали в течение 16 часов в отсутствие или в присутствии 2 нг/мл трансформирующего фактора роста β1 человека (TGFβ1) и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения человека (MYDGF). До

15

(0 часов) и после стимуляции (16 часов) получали цифровые фазово-контрастные изображения. Сходимость (%) рассчитывали как [(площадь, свободная от клеток, через 0 часов – площадь, свободная от клеток, через 16 часов) / площадь, свободная от клеток, через 0 часов] × 100. Результаты показаны ниже в таблице 16.

5

Таблица 16: Миграция фибробластов легких двух пациентов с идиопатическим легочным фиброзом, культивированных в отсутствие (контроль) или в присутствии TGFβ1 и/или MYDGF, после повреждения царапанием

	Количество независимых экспериментов	Сходимость Среднее ± SEM (%)	Значение P
Фибробласты легких пациента №1			
Контроль	4	37,4 ± 1,0	
MYDGF	4	26,7 ± 2,6	<0,05 по сравнению с контролем
TGFβ1	4	38,6 ± 1,5	
TGFβ1 + MYDGF	4	32,5 ± 2,2	P=0,10 по сравнению с TGFβ1
Фибробласты легких пациента №2			
Контроль	8	63,4 ± 2,2	
MYDGF	8	54,0 ± 2,0	<0,05 по сравнению с контролем
TGFβ1	8	64,2 ± 1,2	
TGFβ1 + MYDGF	8	54,6 ± 1,3	<0,001 по сравнению с TGFβ1

10 **Пример 17:**

Фактор роста миелоидного происхождения мыши ингибирует миграцию фибробластов легких пациентов с идиопатическим легочным фиброзом. Фибробласты легких двух пациентов с идиопатическим легочным фиброзом культивировали до достижения конfluence. Монослои царапали 200-мкл наконечником пипетки, промывали и культивировали в течение 16 часов в отсутствие или в присутствии 2 нг/мл трансформирующего фактора роста β1 человека (TGFβ1) и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (Mydgm). До (0 часов) и после стимуляции (16 часов) получали цифровые фазово-контрастные изображения. Сходимость (%) рассчитывали как [(площадь, свободная от клеток, через 0 часов – площадь, свободная от клеток, через 16 часов) / площадь, свободная от клеток, через 0 часов] × 100. Результаты показаны ниже в таблице 17.

Таблица 17: Миграция фибробластов легких двух пациентов с идиопатическим легочным

фиброзом, культивированных в отсутствие (контроль) или в присутствии TGFβ1 и/или MydGF, после повреждения царапанием

	Количество независимых экспериментов	Сходимость Среднее ± SEM (%)	Значение Р
Фибробласты легких пациента №1			
Контроль	3	47,1 ± 1,6	
MydGF	3	36,3 ± 1,1	<0,05 по сравнению с контролем
TGFβ1	3	44,6 ± 2,7	
TGFβ1 + MydGF	3	29,8 ± 2,0	<0,05 по сравнению с TGFβ1
Фибробласты легких пациента №2			
Контроль	3	58,6 ± 1,1	
MydGF	3	44,6 ± 1,6	<0,01 по сравнению с контролем
TGFβ1	3	59,0 ± 3,1	
TGFβ1 + MydGF	3	43,8 ± 1,5	<0,05 по сравнению с TGFβ1

Пример 18:

5 Фактор роста миелоидного происхождения человека ингибирует фосфорилирование SMAD, стимулированное трансформирующим фактором роста β1 (TGFβ1) в фибробластах легких у пациента с идиопатическим легочным фиброзом. Фибробласты легких пациента с идиопатическим легочным фиброзом стимулировали в течение 5, 15, 30 или 60 минут 2 нг/мл рекомбинантного TGFβ1 человека в отсутствие
10 или в присутствии 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения человека (MYDGF). Фосфорилирование (активацию) SMAD определяли с помощью иммуноблоттинга. В качестве положительного контроля использовали низкомолекулярный ингибитор рецептора ALK5/TGFβ I типа SB431542 (10 мкмоль/л; здесь и ниже - приобретенный в Sigma-Aldrich). Результаты показаны на
15 фиг. 1.

Пример 19:

Фактор роста миелоидного происхождения мыши ингибирует фосфорилирование SMAD, стимулированное трансформирующим фактором роста β1
20 (TGFβ1) в фибробластах левого желудочка у пациента с терминальной сердечной недостаточностью. Фибробласты левого желудочка пациента с терминальной сердечной недостаточностью стимулировали в течение 30 минут 2 нг/мл

рекомбинантного TGFβ1 человека в отсутствие или в присутствии 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (Mydgm). Фосфорилирование (активацию) SMAD определяли с помощью иммуноблоттинга. В качестве положительного контроля использовали низкомолекулярный ингибитор рецептора ALK5/TGFβ I типа SB431542 (10 мкмоль/л). Результаты показаны на фиг. 2.

Пример 20:

Фактор роста миелоидного происхождения человека ингибирует фосфорилирование SMAD, стимулированное трансформирующим фактором роста β1 (TGFβ1) в фибробластах левого желудочка у пациента с терминальной сердечной недостаточностью. Фибробласты левого желудочка пациента с терминальной сердечной недостаточностью стимулировали в течение 30 минут 2 нг/мл рекомбинантного TGFβ1 человека в отсутствие или в присутствии 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения человека (MYDGF). Фосфорилирование (активацию) SMAD определяли с помощью иммуноблоттинга. В качестве положительного контроля использовали низкомолекулярный ингибитор рецептора ALK5/TGFβ I типа SB431542 (10 мкмоль/л). Результаты показаны на фиг. 3.

Пример 21:

Фактор роста миелоидного происхождения мыши ингибирует миграцию эмбриональных фибробластов мыши (MEF). MEF выращивали до конfluence. Монослой царапали 200-мкл наконечником пипетки, промывали и культивировали в течение 16 часов в отсутствие или в присутствии 2 нг/мл трансформирующего фактора роста β1 мыши (Tgfβ1) и/или 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (Mydgm). До (0 часов) и после стимуляции (16 часов) получали цифровые фазово-контрастные изображения. Сходимость (%) рассчитывали как [(площадь, свободная от клеток, через 0 часов – площадь, свободная от клеток, через 16 часов) / площадь, свободная от клеток, через 0 часов] × 100. Результаты показаны ниже в таблице 21.

Таблица 21: Миграция эмбриональных фибробластов мыши, культивированных в отсутствие (контроль) или в присутствии Tgfβ1 и/или Mydgm, после повреждения царапанием

	Количество независимых	Сходимость Среднее ± SEM	Значение Р

	экспериментов	(%)	
Контроль	5	24,7 ± 0,3	
Mydgf	5	22,3 ± 0,6	<0,01 по сравнению с контролем
Tgfβ1	5	31,3 ± 1,1	
Tgfβ1 + Mydgf	5	25,0 ± 0,9	<0,01 по сравнению с Tgfβ1

Пример 22:

Фактор роста миелоидного происхождения мыши ингибирует фосфорилирование Smad, стимулируемое трансформирующим фактором роста β1 (Tgfβ1) в эмбриональных фибробластах мыши (MEF). MEF стимулировали в течение 30 минут 2 нг/мл рекомбинантного Tgfβ1 мыши в отсутствие или в присутствии 100 нг/мл рекомбинантного фактора роста миелоидного происхождения мыши (Mydgf). Фосфорилирование (активацию) Smad определяли с помощью иммуоблоттинга. Результаты показаны на фиг. 4.

Пример 23:

MYDGF, полученный из воспалительных клеток, ослабляет ремоделирование сердца во время перегрузки давлением. Для исследования функции MYDGF во время перегрузки давлением мышей с КО *Mydgf* и их однопаметных животных ДТ подвергали операции ТАС. Мыши с КО *Mydgf* размножались и развивались нормально и не демонстрировали явного сердечно-сосудистого фенотипа в исходный момент (Korf-Klingebiel 2015). Градиенты давления в области сужения аорты и соотношения пиковой скорости кровотока в общей сонной артерии справа и слева были аналогичными у мышей ДТ и мышей с КО. Несмотря на сопоставимую тяжесть аортального стеноза, у мышей с КО развилась более выраженная гипертрофия ЛЖ, чем у мышей ДТ (фигура 5А), при этом при гистологическом и одноклеточном исследовании через 7 и 42 суток после ТАС выявили большее увеличение размера кардиомиоцитов (фигура 5В и 5С). По сравнению с мышами ДТ, мыши с КО демонстрировали усиленное снижение экспрессии мРНК *Mylh6* (тяжелой цепи альфа-миозина) на 7 сутки, усиленное увеличение мРНК *Mylh7* (тяжелой цепи бета-миозина) на 7 и 42 сутки, повышенный уровень мРНК *Nppa* (натрийуретического пептида типа А) на 42 сутки и аналогичный рост мРНК *Nppb* (натрийуретического пептида типа В) в

оба момента времени.

Измерения давления в левом желудочке показали, что у мышей с КО развивается более выраженная систолическая и диастолическая дисфункция после ТАС, чем у контрольных животных ДТ (фигура 5D; таблица 22).

5 Таблица 22: Измерение объема левого желудочка у мышей с *Myd8f* дикого типа и мышей с нокаутом *Myd8f*

	ДТ, имитационная операция	КО, имитационная операция	ДТ, ТАС	КО, ТАС
Частота сердечных сокращений (мин ⁻¹)	499 ± 15	500 ± 19	483 ± 7	486 ± 10
LVEDP (мм рт.ст.)	5 ± 1	5 ± 1	9 ± 1	19 ± 4**.#
LVESP (мм рт.ст.)	98 ± 4	103 ± 4	150 ± 7***	149 ± 11**
LVEDV (мкл)	40 ± 3	41 ± 3	45 ± 3	50 ± 7
LVESV (мкл)	14 ± 1	14 ± 2	28 ± 3	42 ± 6***
ФВЛЖ (%)	71 ± 2	71 ± 3	48 ± 3***	29 ± 5***.##
dP/dt _{макс} (мм рт.ст./с)	9836 ± 457	10472 ± 472	7536 ± 323**	6455 ± 273***
dP/dt _{мин} (мм рт.ст./с)	-8645 ± 382	-8764 ± 341	-7923 ± 358	-5341 ± 406***.###
τ (мс)	7,2 ± 0,3	7,2 ± 0,4	8,1 ± 0,4	12,0 ± 1,1***.##

Операцию по поперечному сужению аорты (ТАС) выполняли у мышей с *Myd8f* дикого типа (ДТ) и мышей с нокаутом (КО) (8 мышей в обеих группах). Дополнительных мышей подвергали имитационной операции (6 мышей на группу). Петли «давление-объем» для левого желудочка (ЛЖ) регистрировали черз 7 сут. LVEDP - конечно-диастолическое давление в ЛЖ; LVESP - конечно-систолическое давление в ЛЖ; LVEDV - конечно-диастолический объем ЛЖ; LVESV - конечно-систолический объем ЛЖ; ФВЛЖ - фракция выброса левого желудочка; dP/dt_{макс} - максимальная скорость изменения давления в левом желудочке; dP/dt_{мин} - минимальная скорость изменения давления в левом желудочке. **P<0,01, ***P<0,001 по сравнению с имитационной операцией у мышей того же генотипа; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 КО ТАС по сравнению с ДТ ТАС (двухфакторный ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

Кроме того, получили мышей с химерным костным мозгом для специфического рассмотрения важности MYDGF, полученного из воспалительных клеток, при модуляции гипертрофии ЛЖ и функции сердца во время перегрузки давлением. Трансплантация клеток костного мозга (ВМС) ДТ мышам с КО ингибировала гипертрофию ЛЖ (фигура 6A) и гипертрофию кардиомиоцитов (фигура 6B), усиленную капилляризацию миокарда (фигура 6C) и ослабленную дилатацию ЛЖ (фигура 6D) и систолическую дисфункцию после ТАС (фигура 6E). И наоборот, трансплантация ВМС с КО мышам ДТ усиливала гипертрофию, снижала плотность капилляров и ухудшала ремоделирование ЛЖ и систолическую дисфункцию (фигура 6A-6E). Перенос гена с помощью лентивируса применяли для индуцибельной сверхэкспрессии MYDGF, специфичной для воспалительных клеток, у мышей ДТ (фигура 6F).

У мышей, подвергшихся трансплантации ВМС, трансдуцированного

лентивирусом с MYDGF, добавление доксициклина к питьевой воде усиливало экспрессию белка MYDGF в BMC (в $5,8 \pm 2,2$ раза по сравнению с лентивирусом с MYDGF без доксициклина) и спленocyтaх (в $9,1 \pm 2,7$ раза по сравнению с лентивирусом с MYDGF без доксициклина) (фигура 6G). После операции TAC мыши с лентивирусом с MYDGF, получавшие доксициклин, характеризовались повышенными концентрациями MYDGF в плазме (фигура 6H) и повышенными уровнями экспрессии MYDGF в ЛЖ (фигура 6I) по сравнению с мышами с контрольным лентивирусом, получавшими доксициклин. У мышей с лентивирусом с MYDGF, получавших доксициклин, развилась более легкая гипертрофия левого желудочка после операции TAC (фигура 6J), с кардиомиocyтaми меньшего размера (фигура 6K), несколько более высокой плотностью капилляров ($P=0,11$, фигура 6L), меньшей дилатацией ЛЖ (фигура 6M) и более сохраненной систолической функцией (фигура 6N), чем у мышей с контрольным лентивирусом, получавших доксициклин. Таким образом, сделали вывод, что MYDGF, полученный из воспалительных клеток, необходим и достаточен для ограничения дезадаптивной гипертрофии и ремоделирования при хронической перегрузке давлением.

Пример 24:

Анализ фосфопротеома позволил выявить PIM1 в качестве мишени MYDGF в сигнальном пути в кардиомиocyтaх. Модель гипертрофии *in vitro* разработали для оценки непосредственного адресного воздействия MYDGF на кардиомиocyтaх. Стимуляция ET1 в течение 24 часов увеличивала размер кардиомиocyтaх желудочка новорожденной крысы (NRCM) (фигура 7B), содержание белка (фигура 7C) и экспрессию мРНК генов *Myh7* и *Nppa* (фигура 7D). Хотя рекомбинантный MYDGF сам по себе не влиял на эти конечные показатели, совместное применение MYDGF почти полностью предотвращало гипертрофическую реакцию на ET1; антигипертрофические эффекты MYDGF зависели от концентрации и насыщались при полумаксимальной ингибирующей концентрации 7,6 нг/мл (фигура 7B). MYDGF аналогичным образом ингибировал гипертрофию, индуцированную Ang II, но не ослаблял гипертрофию в ответ на ИФР1 (фигура 7A). В отличие от ET1 и Ang II, способствующих патологическому типу сердечной гипертрофии, инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) способствует физиологическому типу сердечной гипертрофии в кардиомиocyтaх новорожденной крысы, который не ослабляется за счет MYDGF.

Для выявления промежуточного продукта(ов) сигнального пути,

активированного MYDGF, выполнили анализ фосфопротеома с последующим компьютерным выводом киназной активности на основе субстрата (фигура 8A) (Hogrebe et al. *Nat Commun.* 2018;9:1045; Strasser et al. *Integr Biol.* 2019;11:301-314). Данные ЖХ-МС/МС с высоким содержанием собирали через 8 часов после стимуляции NRCM ET1 в отсутствие или в присутствии MYDGF. 423 из 2308 количественно определенных сайтов фосфорилирования, распределенных между 1110 различными белками, дифференциально фосфорилировались в четырех экспериментальных условиях при масштабировании до соответствующих различий в относительном содержании белка.

Неконтролируемая иерархическая кластеризация и анализ главных компонент (фигура 8B) показали, что биологические повторности при каждом состоянии кластеризовались вместе, тем самым подтверждая воспроизводимость рабочего процесса. Указанные четыре условия хорошо разделялись в пространстве главных компонент, что указывало на их связь с различными сигнатурами фосфопротеома.

Используя евклидово расстояние в качестве метрики сходства, авторы наблюдали, что NRCM, совместно обработанные ET1 и MYDGF, демонстрировали промежуточный фенотип, расположенный между ET1 и нестимулированным контролем (фигура 8B). Действительно, MYDGF купировал многие изменения фосфопротеома, вызванные ET1: сайты фосфорилирования, которые более интенсивно фосфорилировались в клетках, обработанных ET1 (по сравнению с нестимулированным контролем), как правило, менее интенсивно фосфорилировались в клетках, совместно стимулированных ET1 и MYDGF (по сравнению с только ET1), и наоборот (фигура 8C). После применения ранее известной информации о взаимодействии киназ и субстрата (Hornbeck et al. *Nucleic Acids Res.* 2015;43: D512-520) к наборам фосфопротеомных данных сделали выводы об изменениях активности киназ, индуцированных MYDGF в клетках, обработанных ET1. На основании дифференциально регулируемых сайтов фосфорилирования и обогащении субстратных мотивов соответствующих киназ прогнозировали, что MYDGF изменяет активность нескольких протеинкиназ, включая сильную активацию серин/треонинкиназы PIM1 (фигура 8D).

PIM1 и его изоформы PIM2 и PIM3 характеризуются аналогичными предпочтениями в отношении субстратов, однако отличающимися профилями экспрессии в тканях (Selten et al. *Cell.* 1986;46:603-611; Qian et al. *J Biol Chem.* 2005;280:6130-6137; Nawijn et al. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:23-34), причем PIM1 является преобладающей изоформой в сердце (Muraski et al. *Nat Med.* 2007;13:1467-1475).

Киназы PIM являются конститутивно активными и регулируются на уровне экспрессии белка (Nawijn 2011). В более раннем исследовании сверхэкспрессия PIM1 защищала NRCM от ET1-индуцированной гипертрофии (Muraski 2007), и поэтому PIM1 стали рассматривать в качестве потенциального кандидата, опосредующего эффекты MYDGF в кардиомиоцитах. На основании полученных авторами фосфопротеомных данных, MYDGF повышал экспрессию PIM1 (фигура 8E) и активность киназ (фигура 8F) в нестимулированных и ET1-стимулированных NRCM. Антигипертрофические эффекты MYDGF снижались за счет низкомолекулярного ингибитора киназы PIM SMI4a (Beharry et al. Mol Cancer Ther. 2009;8:1473-1483; Xia et al. J Med Chem. 2009;52:74-86 (фигура 8G) и с помощью миРНК-опосредованного подавления экспрессии PIM1 (фигура 8H), что демонстрировало, что MYDGF действительно передает сигналы через PIM1.

Пример 25:

MYDGF усиливает экспрессию SERCA2a в кардиомиоцитах за счет PIM1. Аномалии круговорота Ca^{2+} , приводящие к замедлению сокращения и расслабления кардиомиоцитов, часто встречаются в сердце при гипертрофии и сердечной недостаточности (Houser et al. J Mol Cell Cardiol. 2000;32:1595-1607). Снижение экспрессии и/или активности Ca^{2+} -АТФазы 2a сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA2a), приводящее к нарушению секвестрации Ca^{2+} в сарко/эндоплазматический ретикулум, может вносить вклад в дефектную регуляцию уровня Ca^{2+} при сердечной недостаточности (Luo et al. Circ Res. 2013;113:690-708). Как сообщалось ранее, PIM1 стимулирует экспрессию SERCA2a (Muraski et al. Nat Med. 2007;13: 1467-1475), авторы исследовали наличие или отсутствие контроля относительного содержания SERCA2a за счет MYDGF. Действительно, увеличение экспрессии PIM1 в MYDGF-стимулированных NRCM сопровождалось увеличением экспрессии белка Serca2a (Фигура 9A). Ингибирование или миРНК-опосредованное снижение уровня экспрессии PIM1 предотвращало повышение уровня Serca2a, что демонстрировало, что MYDGF контролирует экспрессию SERCA2a за счет PIM1 (фигура 9B).

Уровни белка SERCA2a в миокарде ЛЖ *in vivo* были сопоставимы у мышей с *Mydgf* ДТ и с КО *Mydgf* после имитационной операции (фигура 9C). После операции ТАС экспрессия SERCA2a у мышей ДТ все еще сохранялась на 7 сутки (-17%, $P=0,14$), но уменьшалась на 42 сутки. В оба момента времени экспрессия SERCA2a была значительно ниже у мышей с КО, чем у мышей ДТ (фигура 9C). Мыши ДТ и мыши с

КО с имитационной операцией характеризовались аналогичными уровнями экспрессии белка PIM1 и SERCA2a в выделенных кардиомиоцитах ЛЖ (фигура 9D). Экспрессия PIM1 в кардиомиоцитах повышалась после ТАС у мышей ДТ, но не у мышей с КО. Неспособность мышей с КО увеличивать экспрессию PIM1 после ТАС была ассоциирована с сильным снижением количества SERCA2a в кардиомиоцитах (фигура 9D).

Для специфического определения наличия или отсутствия регуляции экспрессию PIM1 и SERCA2a в перегруженном давлением сердце за счет MYDGF, полученного из воспалительных клеток, трансгенных по *MydGF* мышей с химерным костным мозгом или с экспрессией *MydGF* в костном мозге в определенных условиях подвергали операции ТАС. Трансплантация ВМС ДТ мышам с КО *MydGF* увеличивала, а трансплантация ВМС с КО мышам ДТ уменьшала относительное содержание PIM1 и SERCA2a в ЛЖ после ТАС (фигура 9E). Кроме того, мыши с лентивирусом с MYDGF, получавшие доксициклин, характеризовались более высокими уровнями экспрессии PIM1 и SERCA2a в ЛЖ, чем мыши с контрольным лентивирусом, получавшие доксициклин (фигура 9F). Сделали вывод, что MYDGF, полученный из воспалительных клеток, необходим и достаточен для усиления экспрессии PIM1 и SERCA2a в левом желудочке, перегруженном давлением.

Пример 26:

Исследовали терапевтический потенциал MYDGF при перегрузке давлением. Мышам вводили рекомбинантный MYDGF в течение 28 суток после операции ТАС, используя подкожно имплантированные осмотические мини-насосы для непрерывной доставки белка (10 мкг/сут) (фигура 10A). Через трое суток после ТАС в плазме мышей, получавших MYDGF, были более высокие концентрации MYDGF, чем у контрольных мышей, получавших только разбавитель (фигура 10B). Через семь суток после ТАС у мышей, получавших MYDGF, наблюдали более высокую экспрессию белка SERCA2a в выделенных кардиомиоцитах желудочков (фигура 10C), и в течение 28 суток у этих животных развилась менее выраженная дилатация ЛЖ (фигура 10D) и систолическая дисфункция (фигура 10E). Эффекты, направленные против ремоделирования, были ассоциированы с ослабленной реакцией на гипертрофию (фигура 10F) с меньшим размером кардиомиоцитов (фигура 10G), повышенной

плотностью капилляров в миокарде ЛЖ (фигура 10) и выраженным благоприятным действием на выживаемость (фигура 10I).

В частности, примеры 23, 24, 25 и 26 демонстрировали, что MYDGF защищает от сердечной недостаточности, вызванной перегрузкой давлением у мышей. Реализация острой перегрузки давлением за счет операции ТАС вызывала быстрое увеличение относительного содержания MYDGF в левом желудочке, причем моноциты и макрофаги становились основными типами клеток, продуцирующих MYDGF. Рекрутинг и дифференцировка циркулирующих CCR2^{high} моноцитов и пролиферация макрофагов, находящихся в сердце, приводят к заметному увеличению пула макрофагов при перегрузке давлением.

После ТАС у мышей с КО *Mydgf* развилась более тяжелая гипертрофия ЛЖ с увеличением размера кардиомиоцитов по сравнению с мышами дикого типа. Усиленная гипертрофия у мышей с КО характеризовалась нарушением круговорота Ca²⁺ и функции саркомеров, более выраженной активацией эмбрионального гена, снижением плотности микрососудов, усилением интерстициального фиброза и усилением дилатации ЛЖ, а также систолической и диастолической дисфункцией - все это признаки неадаптивной реакции на перегрузку давлением.

Физические упражнения не провоцировали размножение миелоидных клеток в сердце. Соответственно, экспрессия MYDGF в левом желудочке у мышей, получавших или не получавших физическую нагрузку, была сравнительно низкой, и у мышей с КО *Mydgf*, получавших физическую нагрузку, так же развивалась физиологическая гипертрофия, как и у их однопометников дикого типа.

Действуя на кардиомиоциты, MYDGF ослаблял клеточную гипертрофию и улучшал круговорот Ca²⁺ и функцию саркомеров за счет усиления экспрессии SERCA2a. Фосфопротеомика выявила конститутивно активную серин/треонинкиназу PIM1 в качестве одной потенциальной мишени MYDGF на последующих стадиях метаболизма. Действительно, ингибирование или угнетение экспрессии PIM1 устраняло антигипертрофические и индуцирующие SERCA2a эффекты MYDGF в культивируемых кардиомиоцитах.

Показано, что лечение рекомбинантным MYDGF опосредовало благоприятное влияние на форму ЛЖ, систолическую функцию и выживаемость во время постоянного постнагрузочного стресса.

Формула изобретения

1. Фактор роста миелоидного происхождения (MYDGF) или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении
5 или профилактике фиброза или гипертрофии.
2. MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности, причем сердечная недостаточность предпочтительно представляет собой хроническую
10 сердечную недостаточность.
3. MYDGF или его фрагмент или вариант для применения по п. 2, отличающийся тем, что сердечная недостаточность или хроническая сердечная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFrEF), сердечную недостаточность с уменьшенной фракцией выброса (HFmrEF),
15 сердечную недостаточность с фракцией выброса среднего диапазона (HFmrEF).
4. MYDGF для применения по п. 1, 2 или 3, отличающийся тем, что указанный MYDGF содержит:
20 (i) SEQ ID NO: 1; или
(ii) фрагмент или вариант SEQ ID NO: 1, проявляющий биологическую функцию MYDGF, и
причем указанный вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной
25 последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.
5. Фактор роста MYDGF для применения по любому из пп. 1 или 4, отличающийся тем, что фиброз представляет собой фиброз сердца и/или легкого, причем фиброз предпочтительно представляет собой интерстициальное заболевание легких,
30 предпочтительно прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких и более предпочтительно идиопатический легочный фиброз.
6. Фактор роста MYDGF для применения по п. 1 или 4, отличающийся тем, что указанная гипертрофия представляет собой гипертрофию кардиомиоцитов.

7. Нуклеиновая кислота, кодирующая фактор роста MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

5

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая фактор роста MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности.

10 9. Нуклеиновая кислота для применения по п. 7 или 8, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, характеризующаяся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

15 10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 7 или 8, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

11. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 8 или 9, для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности.

20

12. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 7 или вектор по п. 10 и экспрессирующая указанную нуклеиновую кислоту, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

25 13. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 8 или вектор по п. 11 и экспрессирующая указанную нуклеиновую кислоту, для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая MYDGF по любому из пп. 1, 4-6, нуклеиновую кислоту по п. 6 или 8, вектор по п. 9 или клетку-хозяина по п. 11 и, необязательно, подходящее фармацевтическое вспомогательное вещество, для применения при лечении или профилактике фиброза или гипертрофии.

30

15. Фармацевтическая композиция, содержащая MYDGF по любому из пп. 2-6, нуклеиновую кислоту по п. 8 или 9, вектор по п. 11 или клетку-хозяина по п. 13 и, необязательно, подходящее фармацевтическое вспомогательное вещество, для применения при лечении или профилактике сердечной недостаточности.

5

16. Фармацевтическая композиция для применения по п. 14 или 15, отличающаяся тем, что указанную фармацевтическую композицию вводят пероральным, внутривенным, подкожным, интрамукозальным, внутриартериальным, внутримышечным или внутрикоронарным путем.

10

17. Фармацевтическая композиция для применения по п. 16, отличающаяся тем, что введение осуществляют посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний.

15 18. Способ лечения фиброза, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества MYDGF или его фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный MYDGF содержит:

20 (i) SEQ ID NO: 1; или

(ii) ее фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF SEQ ID NO: 1, и

причем указанный вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

25

20. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный фиброз представляет собой фиброз сердца и/или легких, предпочтительно отличающийся тем, что указанный фиброз представляет собой интерстициальное заболевание легких, предпочтительно прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких и более предпочтительно идиопатический легочный фиброз.

30

21. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством

одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

22. Способ лечения гипертрофии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества MYDGF или его фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанный MYDGF содержит:

(i) SEQ ID NO: 1; или

(ii) ее фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF SEQ ID NO: 1, и

причем указанный фрагмент или вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.

24. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанная гипертрофия представляет собой гипертрофию кардиомиоцитов.

25. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанный MYDGF или его фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF, вводят посредством одной или более болюсных инъекций и/или вливаний, предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе.

26. Способ лечения или профилактики сердечной недостаточности, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фактора роста MYDGF или его фрагмента или варианта, проявляющего биологическую функцию MYDGF, причем сердечная недостаточность предпочтительно представляет собой хроническую сердечную недостаточность.

27. Способ лечения сердечной недостаточности по п. 26, отличающийся тем, что указанная сердечная недостаточность или хроническая сердечная недостаточность представляет собой HFpEF или HFrEF, предпочтительно указанная HFpEF представляет собой HFpEF стадии C или стадии D, или указанная HFrEF представляет собой HFrEF стадии C или стадии D.

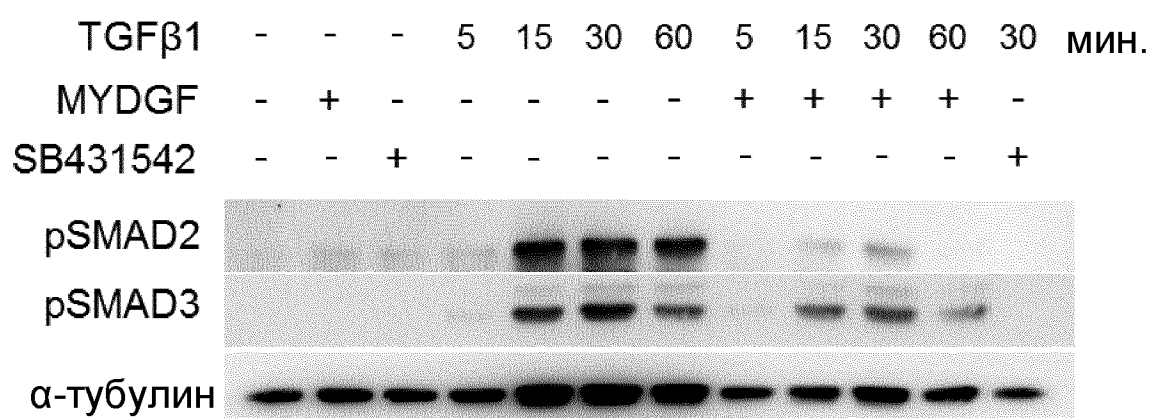
28. Способ по п. 26 или 27, отличающийся тем, что указанный MYDGF содержит:

(i) SEQ ID NO: 1; или

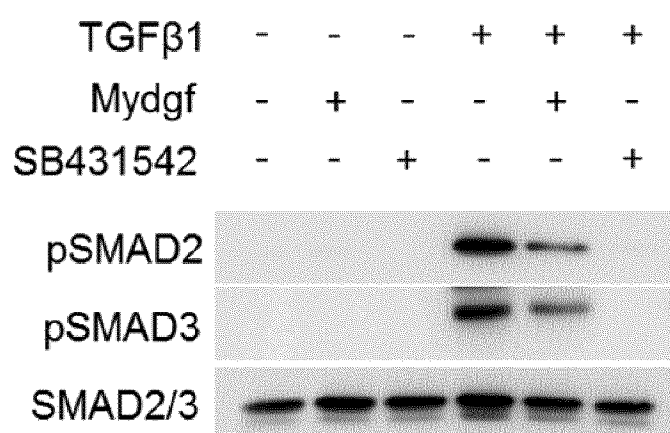
(ii) ее фрагмент или вариант, проявляющий биологическую функцию MYDGF SEQ ID NO: 1, и

5

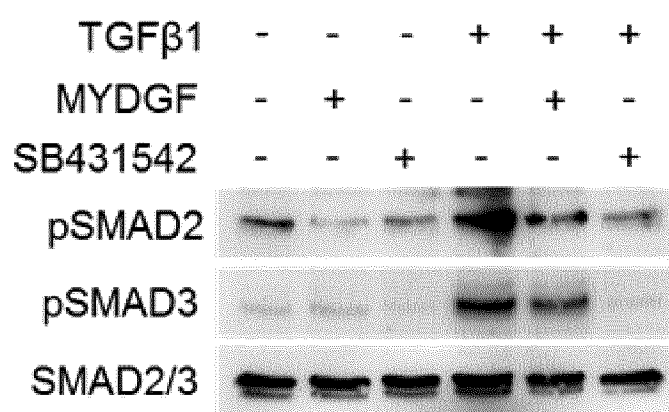
причем указанный фрагмент или вариант содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:1.



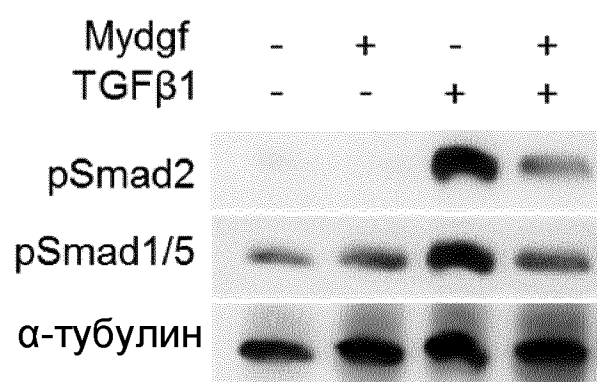
Фиг. 1



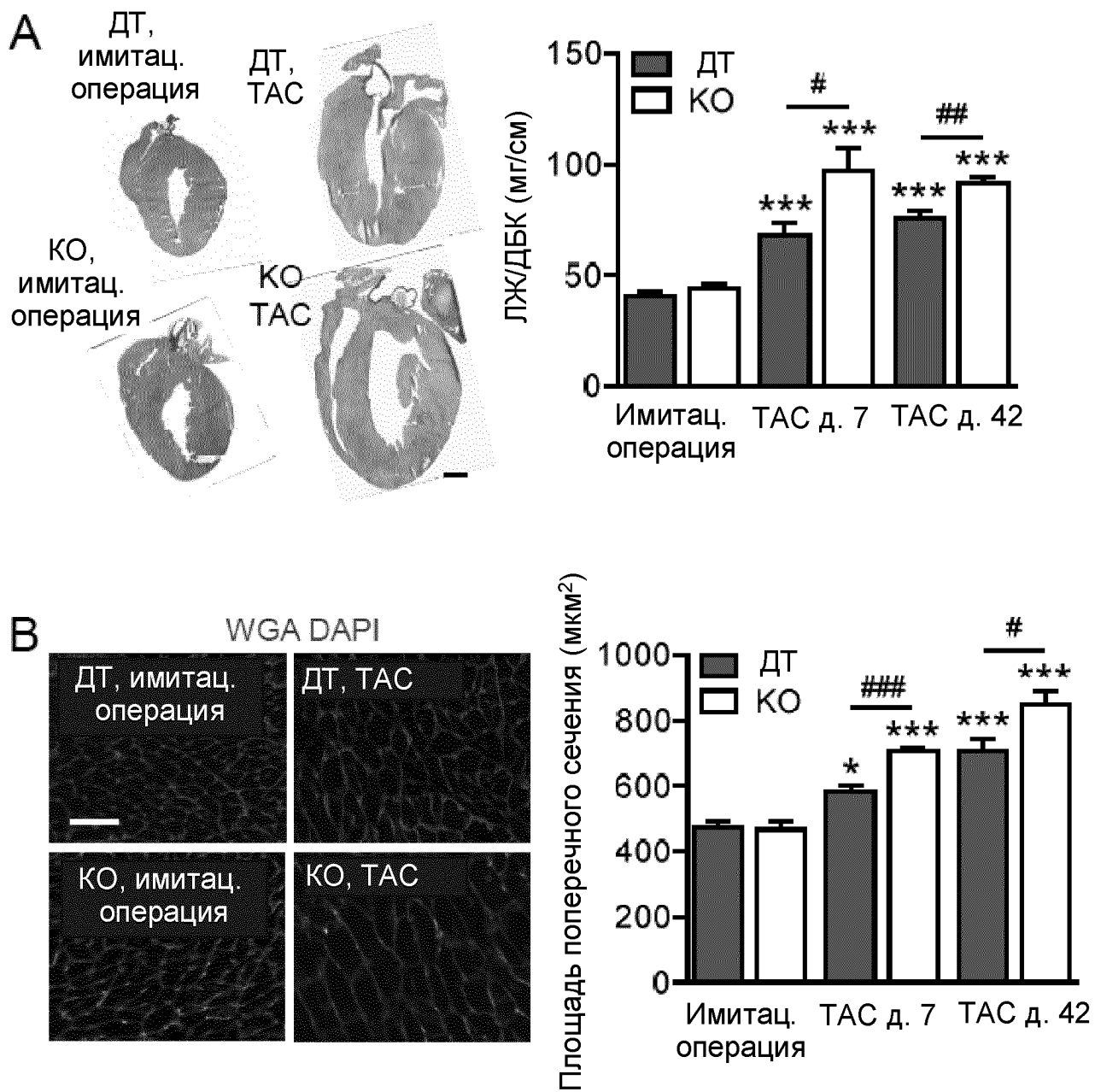
Фиг. 2



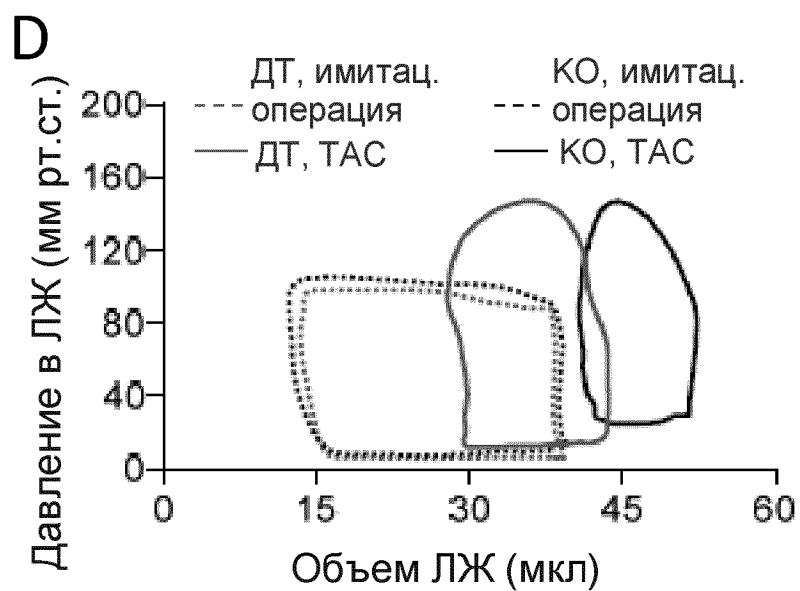
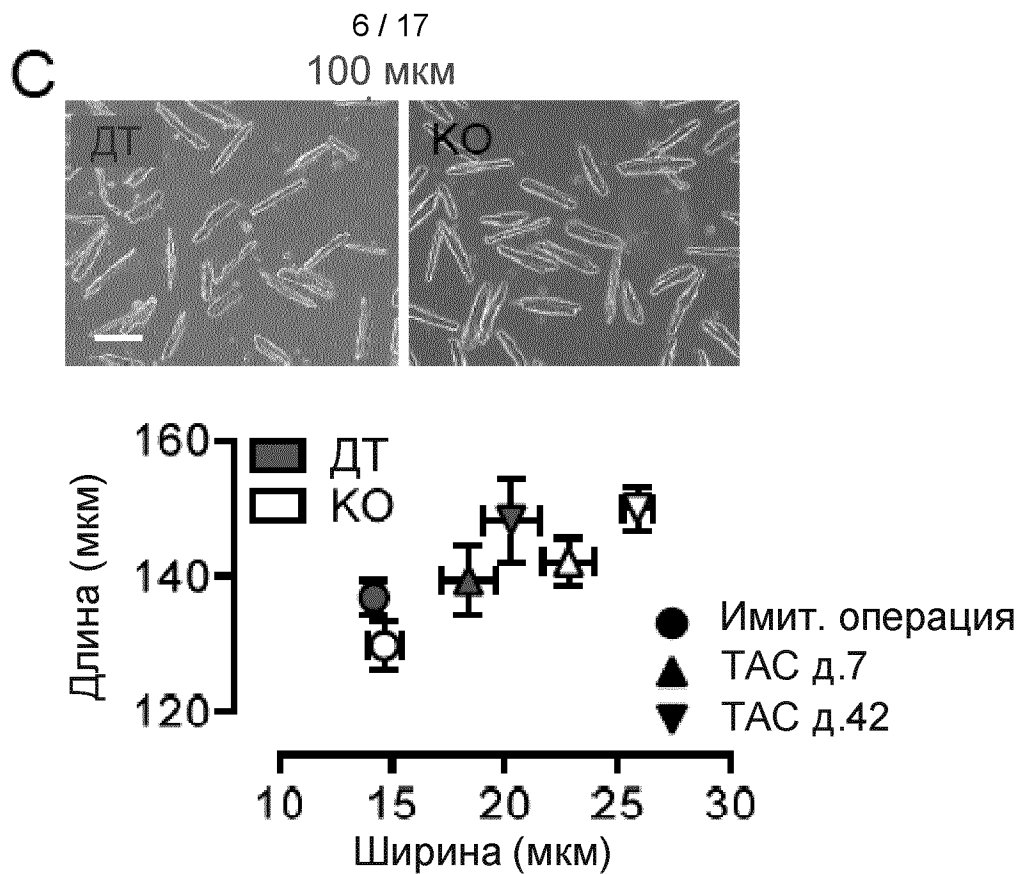
Фиг. 3



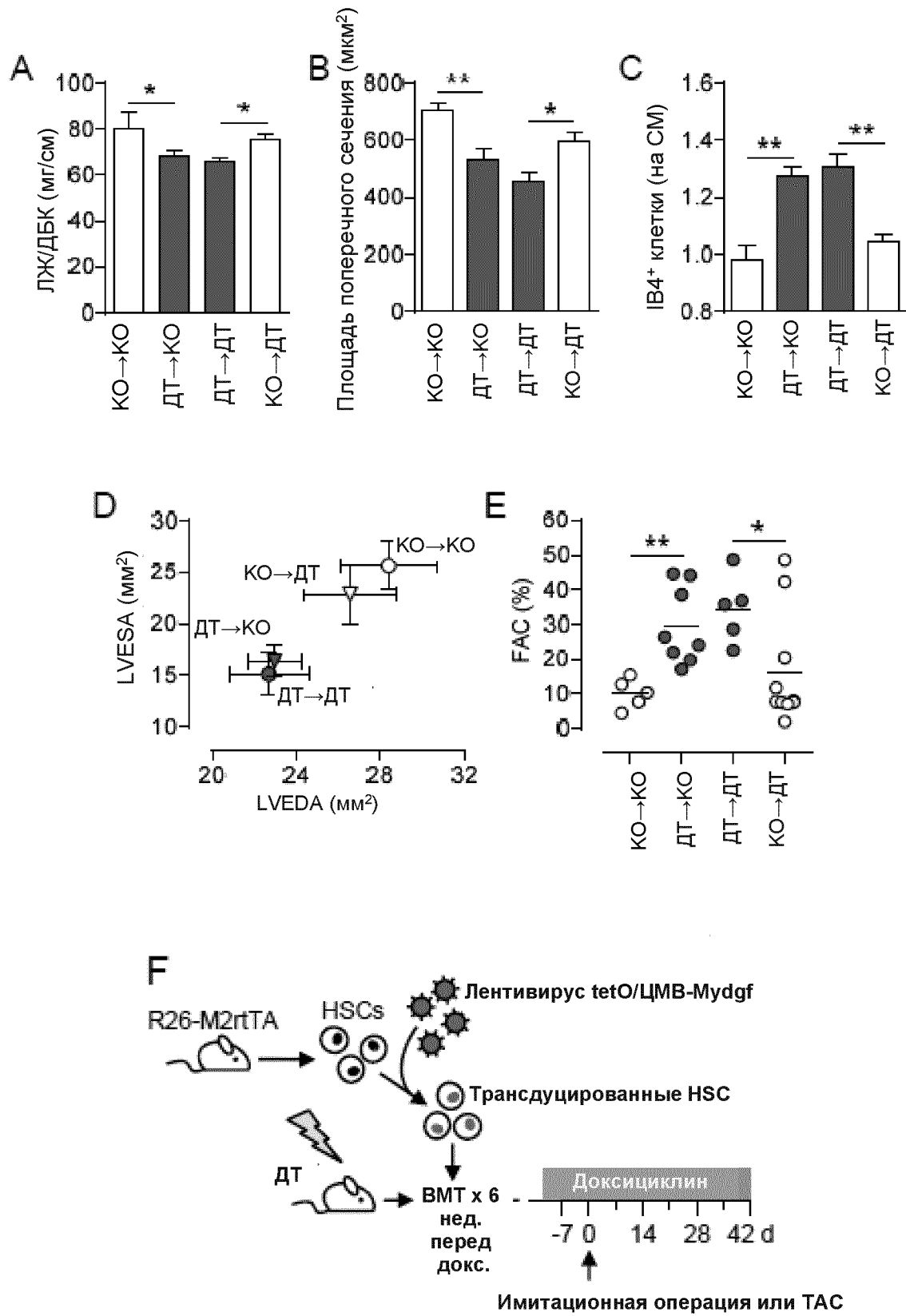
Фиг. 4



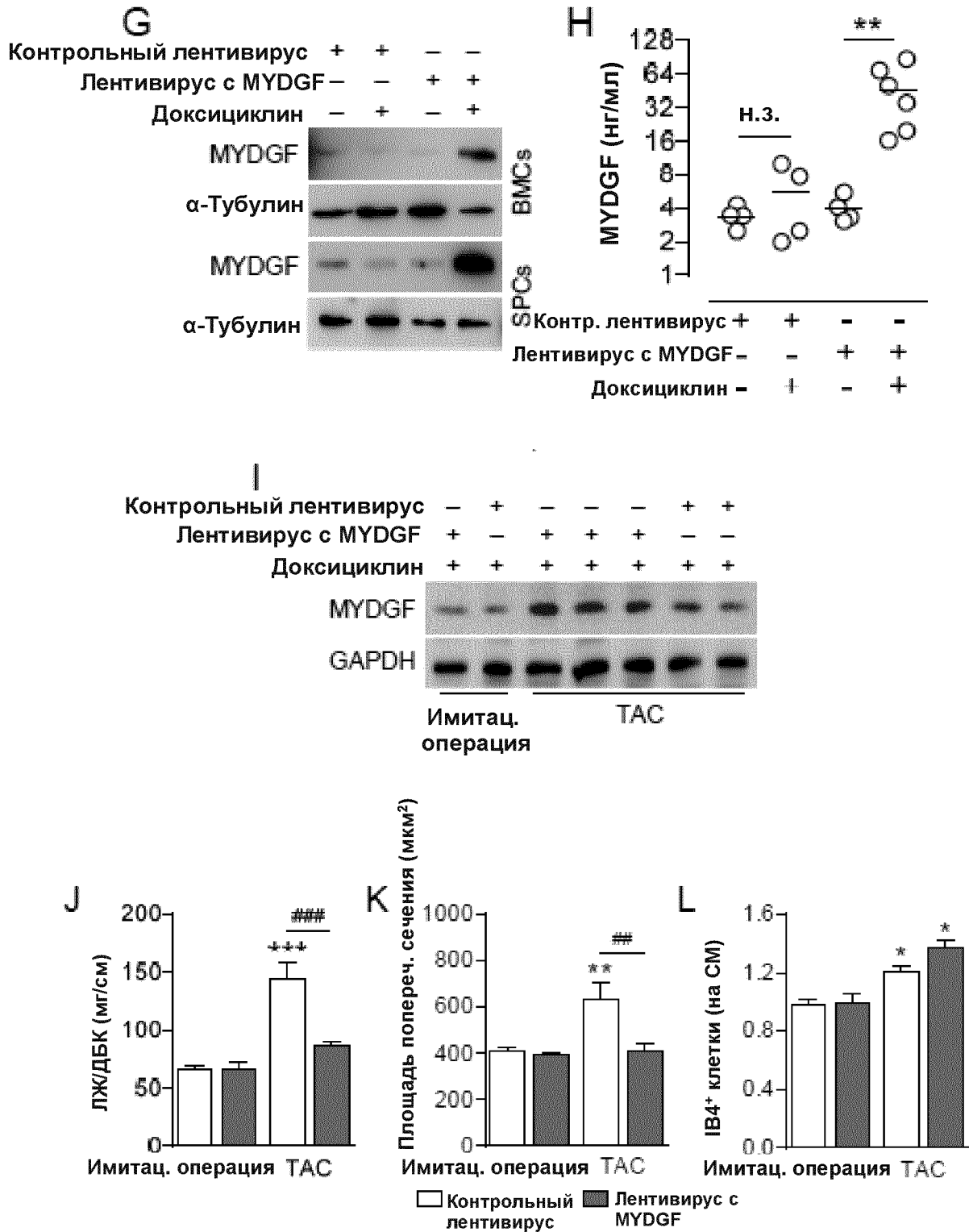
Фиг. 5



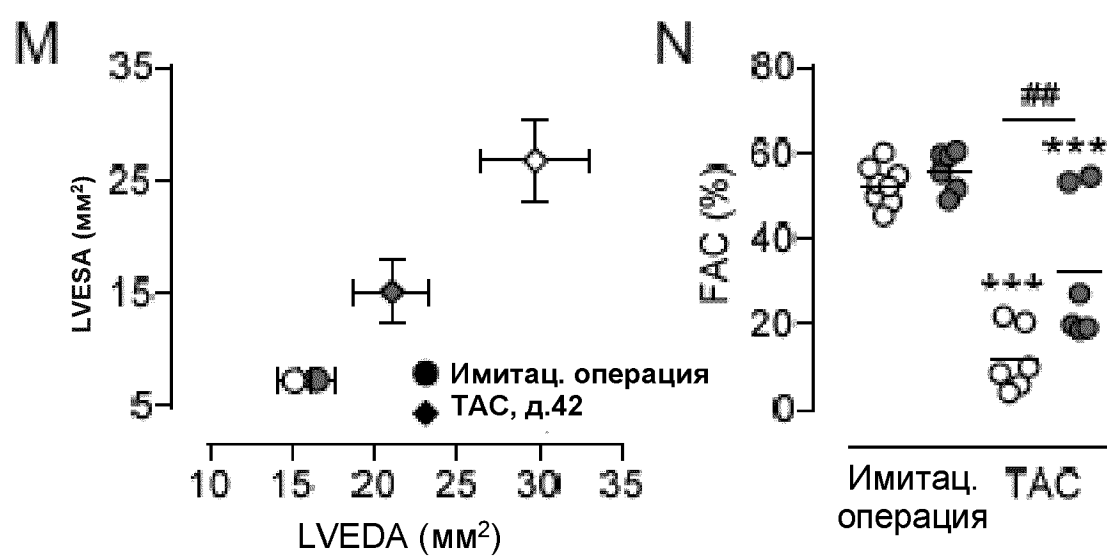
Фиг. 5
продолж.



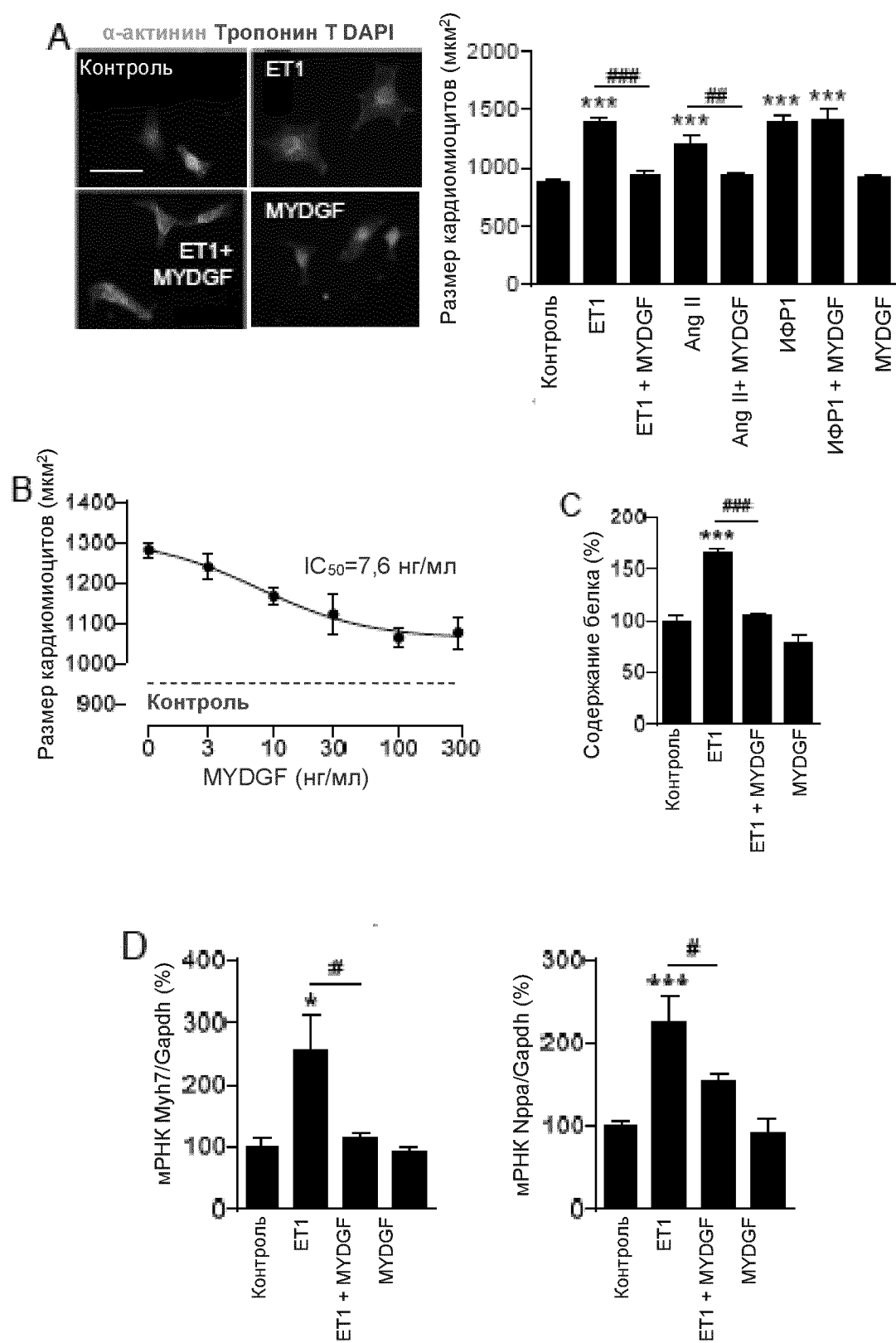
Фиг. 6



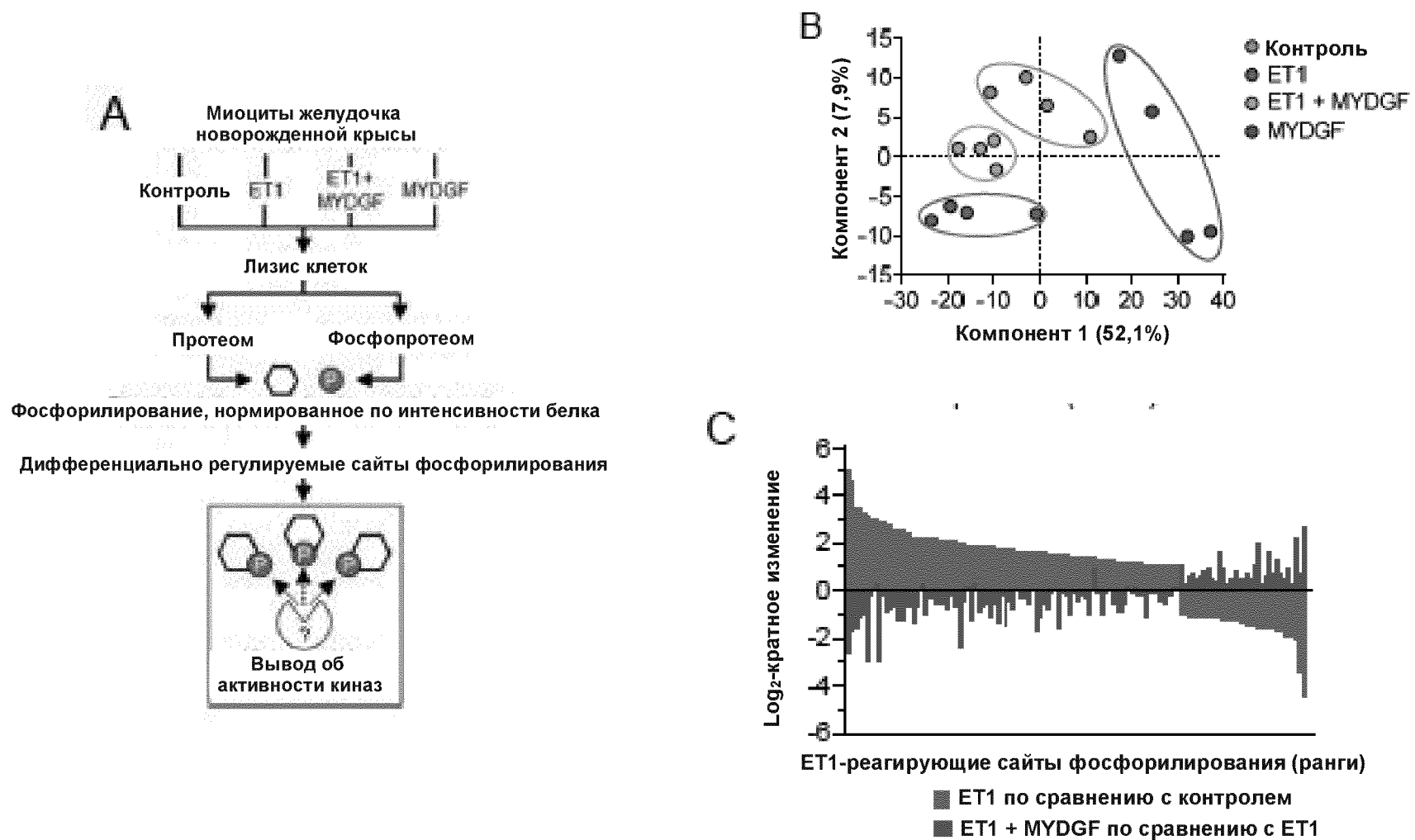
Фиг. 6
продолж.



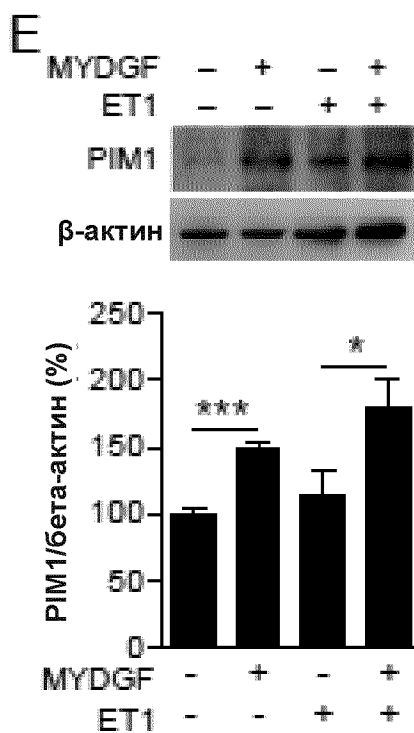
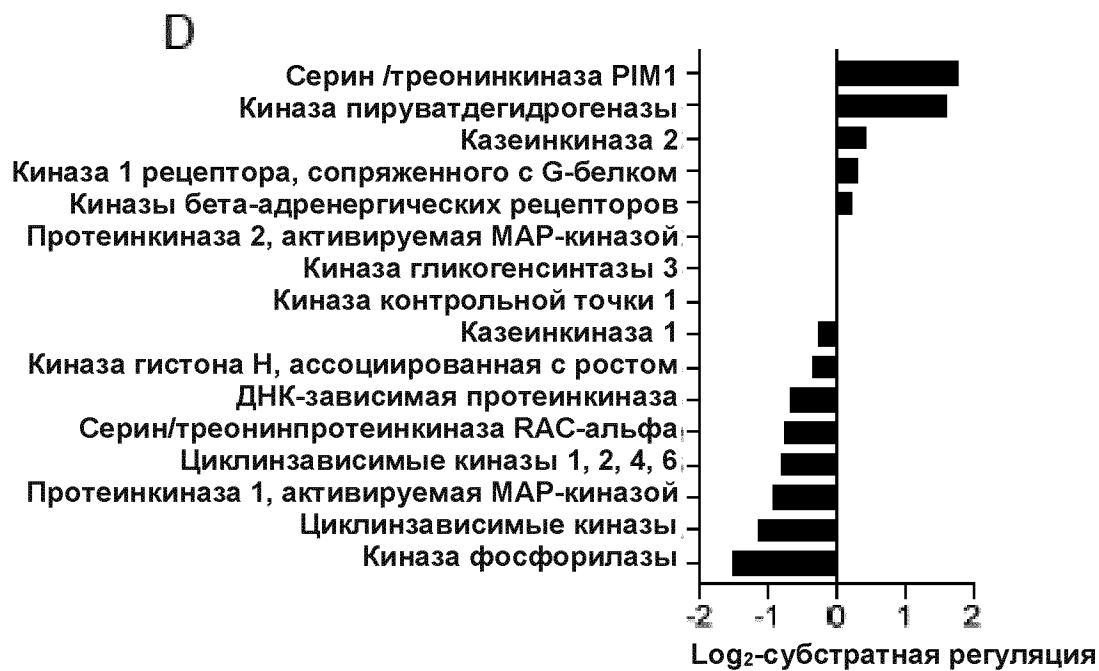
Фиг. 6
продолж.



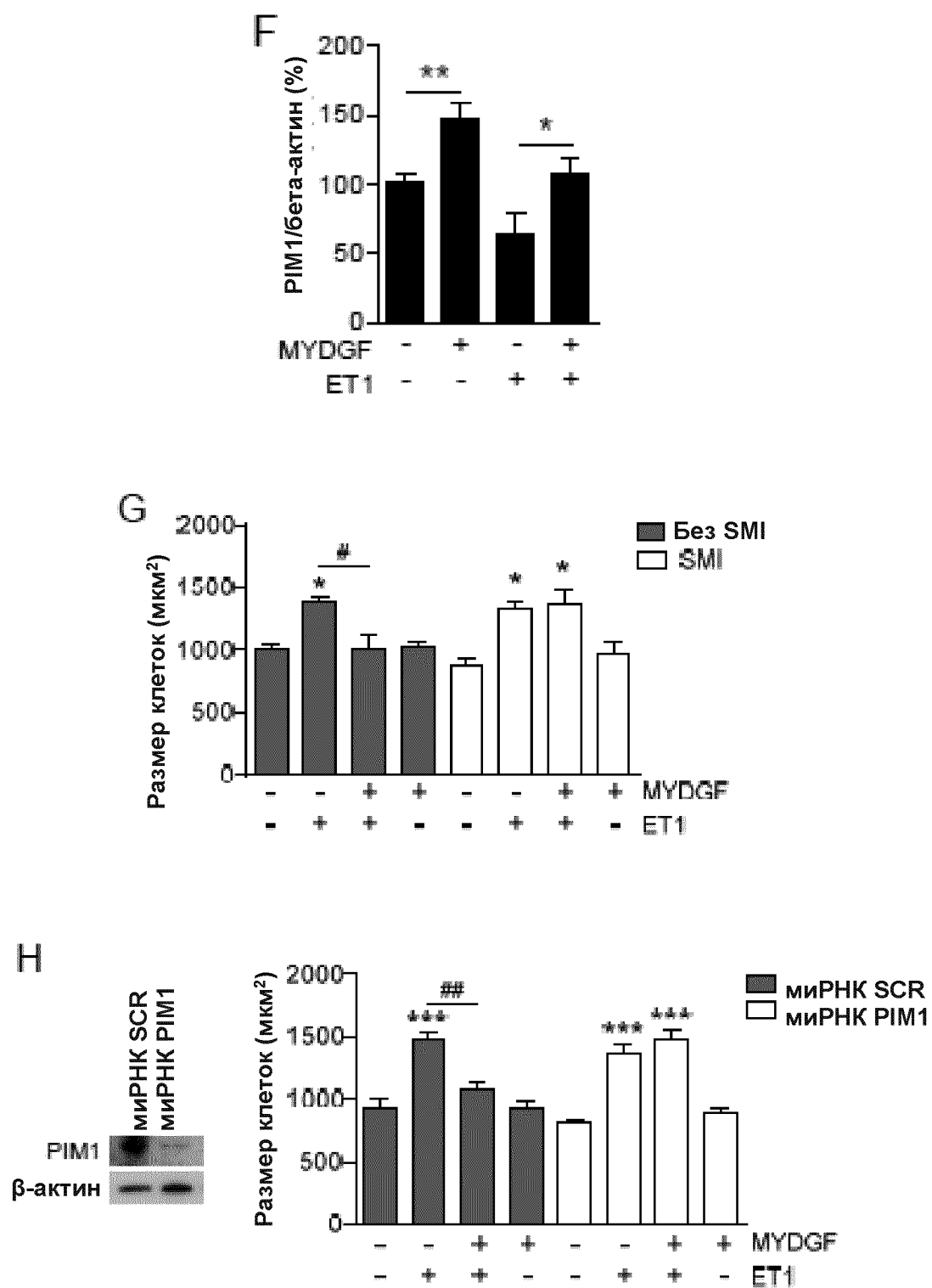
Фиг. 7



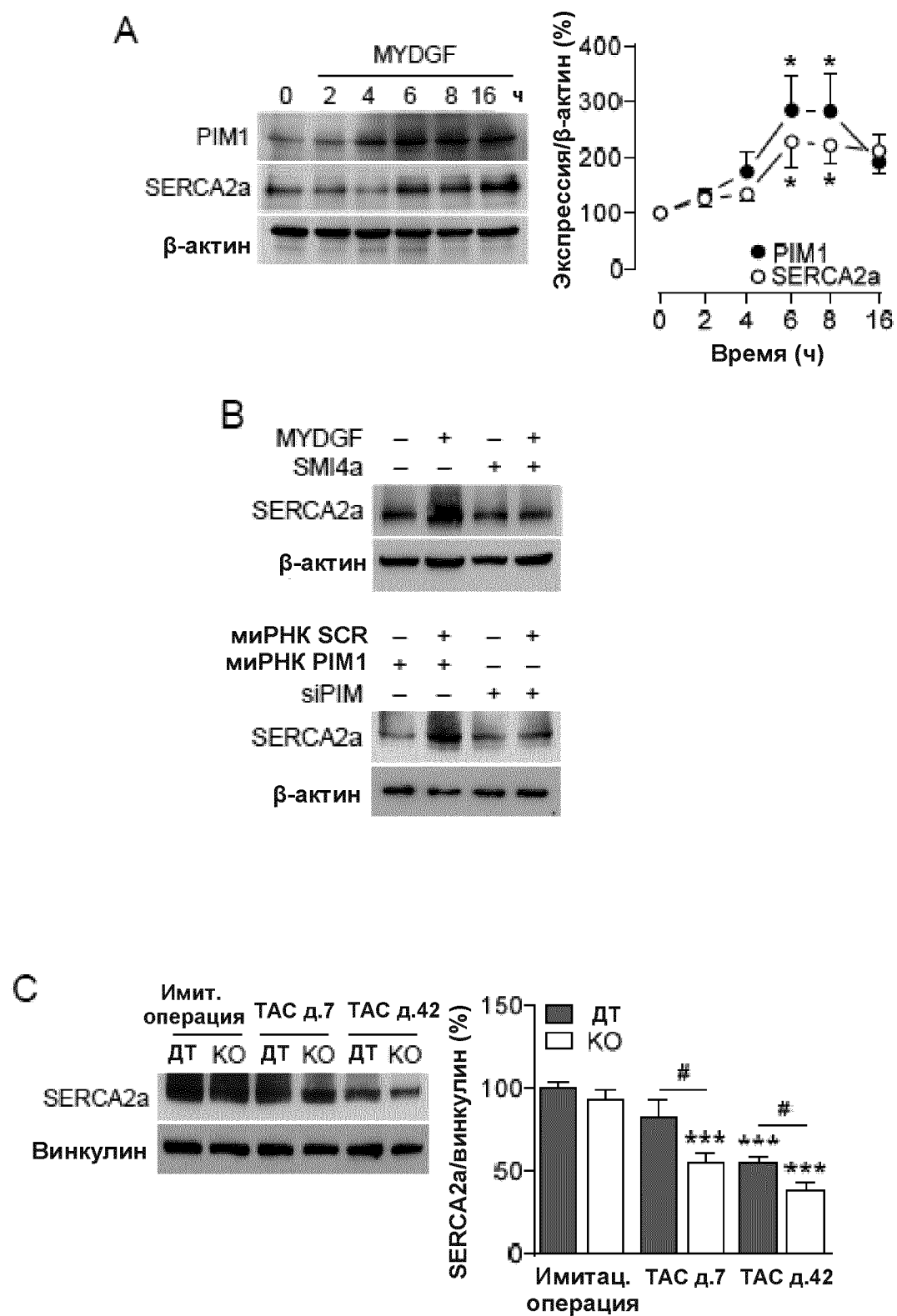
Фиг. 8



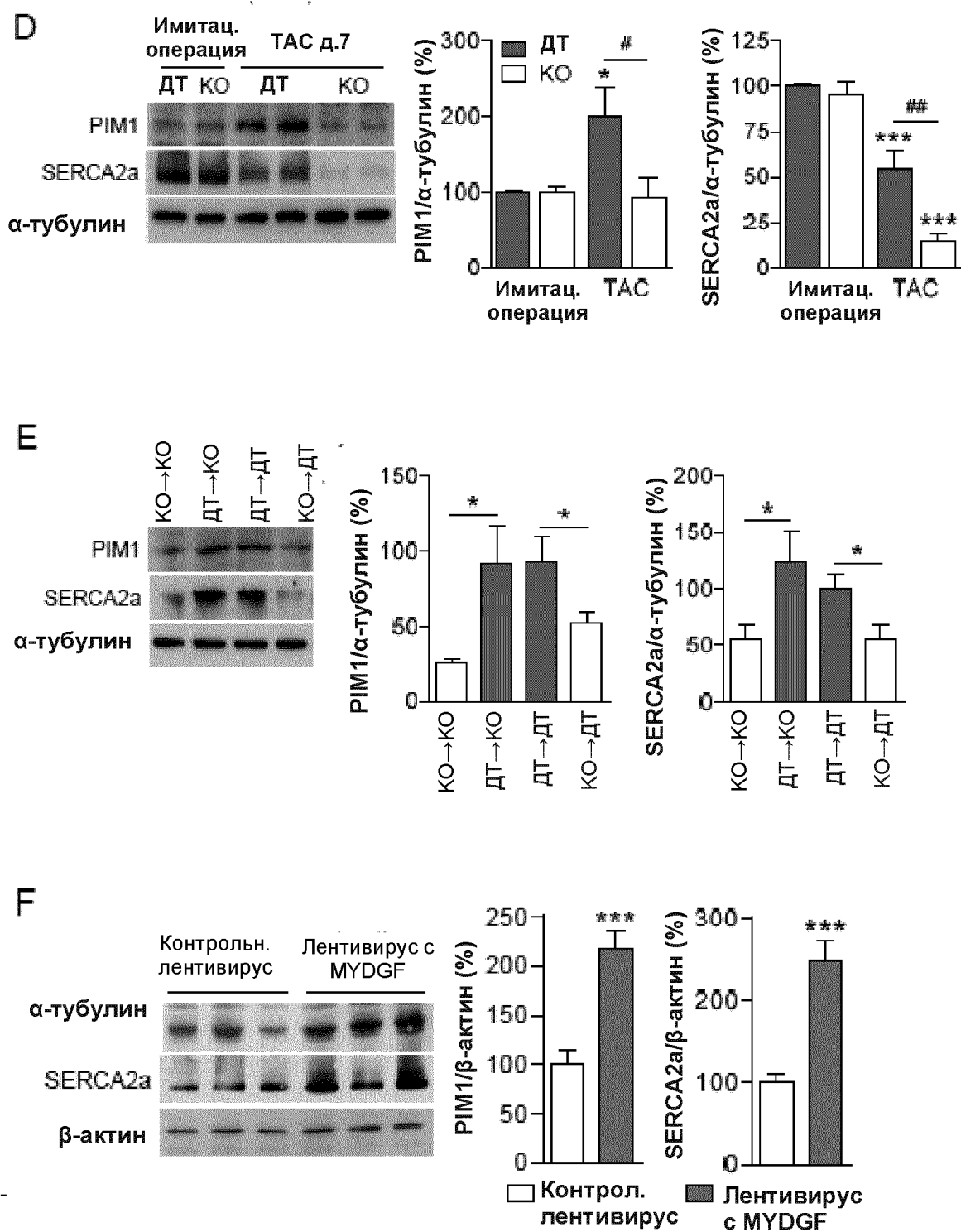
Фиг. 8
продолж.



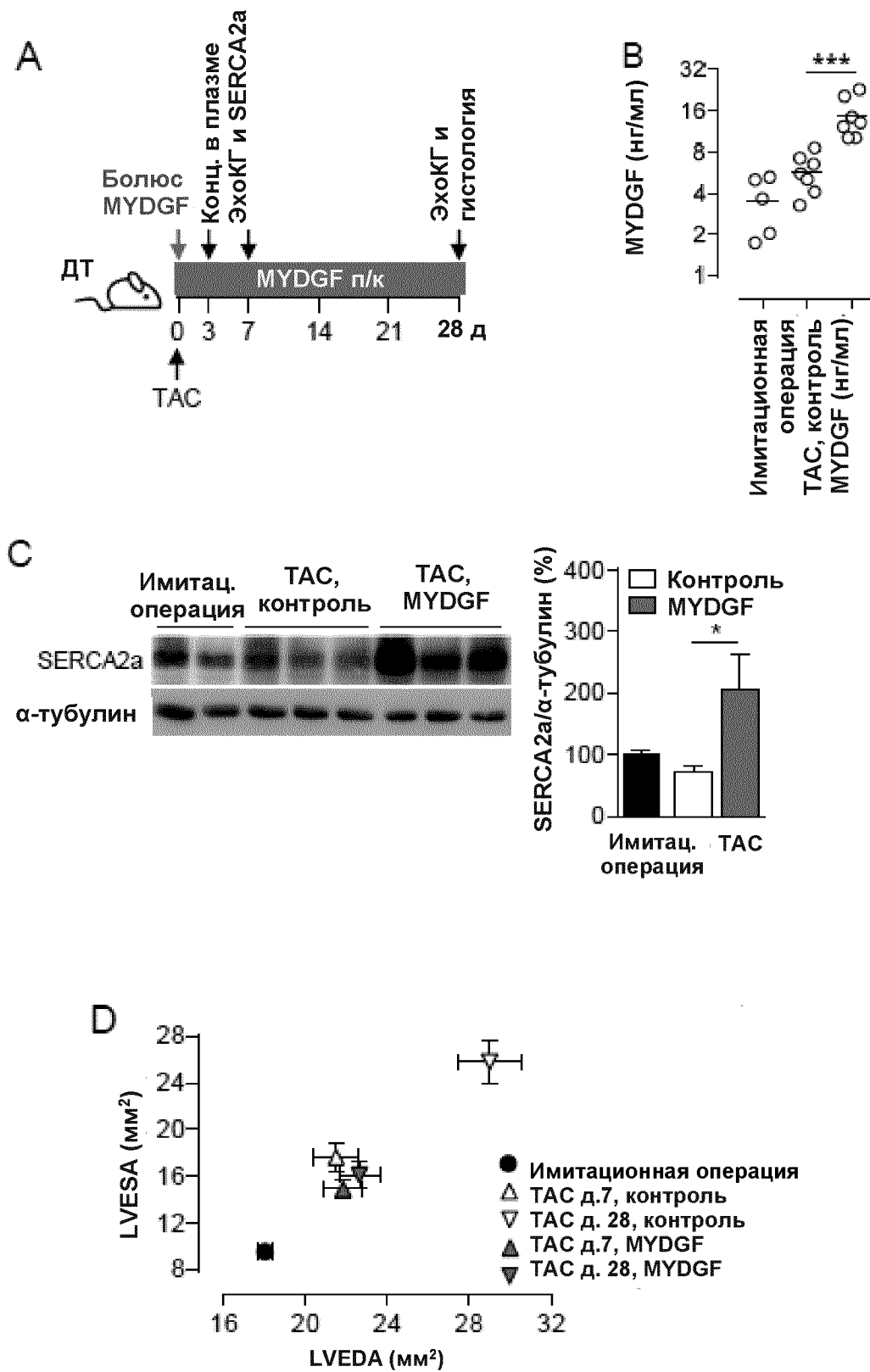
Фиг. 8
продолж.



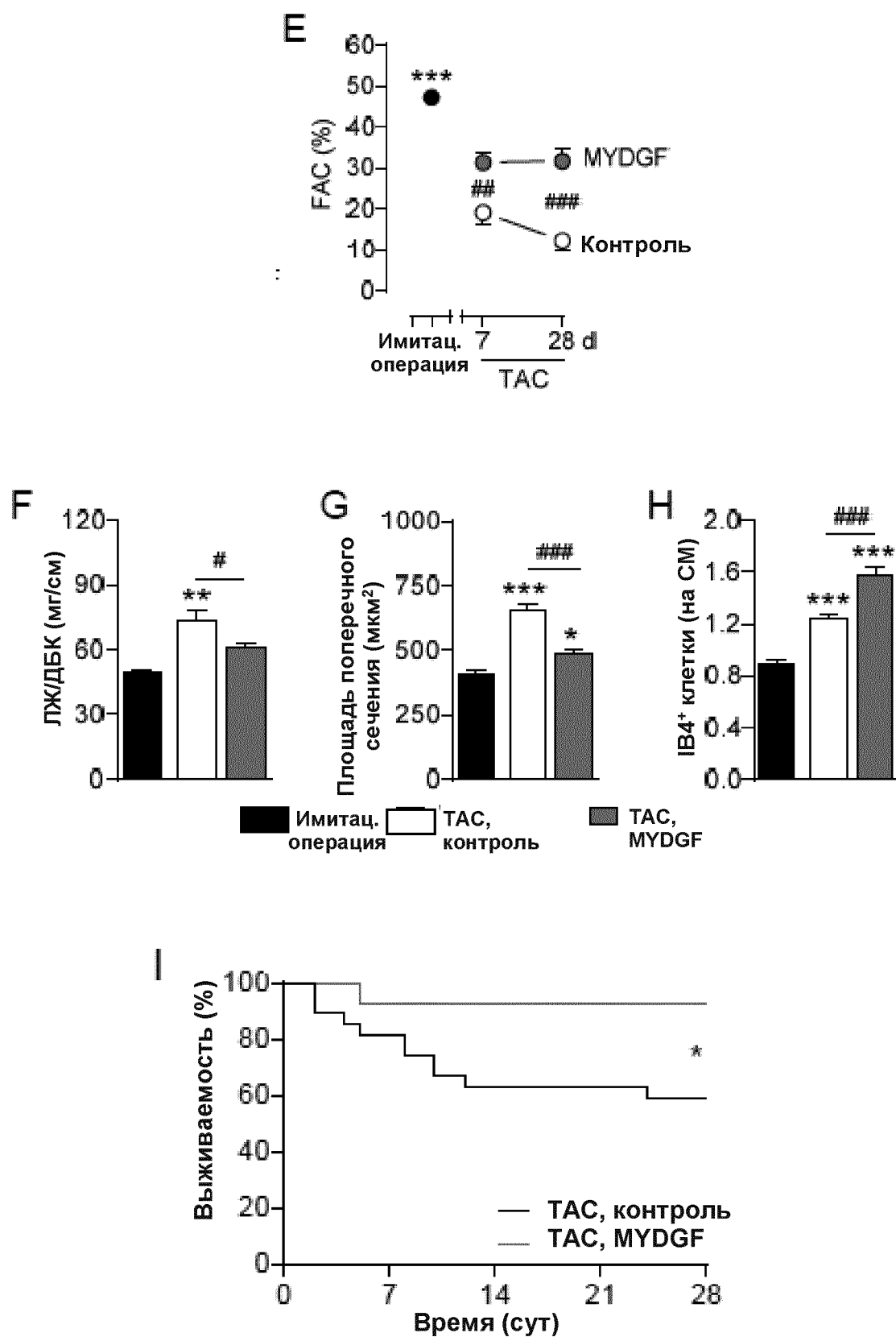
Фиг. 9



Фиг. 9
продолж.



Фиг. 10



Фиг. 10
продолж.