



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента

**2024.08.29**

**(21)** Номер заявки

**202191649**

**(22)** Дата подачи заявки

**2020.01.21**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61K 31/167** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**A61P 39/02** (2006.01)

**(54) ЛЕЧЕНИЕ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ**

**(31)** **1900811.9; 1907839.3; 1915003.6**

**(32)** **2019.01.21; 2019.06.03; 2019.10.17**

**(33)** **GB**

**(43)** **2021.12.02**

**(86)** **PCT/EP2020/051332**

**(87)** **WO 2020/152122 2020.07.30**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

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

**(72)** Изобретатель:

**Кук Стюарт Александр, Шефер  
Себастиан, Виджая Анисса Аниндия  
(SG)**

**(74)** Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** Anissa Anindya Widjaja ET AL.: "00417 Neutralizing Anti-IL-11 Antibodies Protect Against Hepatic Fibrosis in Non- alcoholic Steatohepatitis", Hepatology 68 Supplement 1 69th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD 2018 20181109 to 20181113, 9 November 2018 (2018-11-09), page 1348A, XP55686182, Retrieved from the Internet: URL:https://www.singhealthacademy.edu.sg/sites/sdc2018/Abstracts/Documents/00417.pdf [retrieved on 2020-04-16], the whole document

SEBASTIAN SCHAFFER ET AL.: "IL11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis", NATURE, 7 December 2017 (2017-12-07), XP055472896, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature24676 page 7, line 8 - line 11 Extended Data Fig. 4d, 4h, 4i, 4m, 4n

UNDERHILL-DAY N ET AL.: "FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF W147A: A HIGH-AFFINITY INTERLEUKIN-11 ANTAGONIST", ENDOCRINOLOGY, THE ENDOCRINE SOCIETY,

US, vol. 144, no. 8, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 3406-3414, XP009016241, ISSN: 0013-7227, DOI: 10.1210/EN.2002-0144, the whole document

ELSHABRAWY HATEM A ET AL.: "IL-11 facilitates a novel connection between RA joint fibroblasts and endothelial cells", ANGIOGENESIS, KLUWER, DORDRECHT, NL, vol. 21, no. 2, 11 January 2018 (2018-01-11), pages 215-228, XP036470070, ISSN: 0969-6970, DOI: 10.1007/S10456-017-9589-Y [retrieved on 2018-01-11], page 218, left-hand column

JOHN Y. L. CHIANG: "Targeting bile acids and lipotoxicity for NASH treatment : Chiang", HEPATOLOGY COMMUNICATIONS, vol. 1, no. 10, 1 December 2017 (2017-12-01), pages 1002-1004, XP055686262, ISSN: 2471-254X, DOI: 10.1002/hep4.1127, abstract

William L Trepicchio ET AL.: "Protective Effect of rhIL-11 in a Murine Model of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity Departments of Molecular Medicine", TOXICOLOGIC PATHOLOGY, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 242-249, XP55686194, Retrieved from the Internet: URL:https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1080/019262301317052521, the whole document

BOURDI MOHAMMED ET AL.: "Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: Role of inducible nitric oxide synthase", HEPATOLOGY, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 35, no. 2, 30 October 2002 (2002-10-30), pages 289-298, XP029577123, ISSN: 0270-9139, DOI: 10.1053/JHEP.2002.30956, page 292, left-hand column

KENNETH J. SIMPSON ET AL.: "Inhibition of tumour necrosis factor alpha does not prevent experimental paracetamol-induced hepatic necrosis", THE JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 190, no. 4, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 489-494, XP55686195, ISSN: 0022-3417, DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<489:: AID-PATH534>3.0.CO; 2-V, Discussion

Anissa A. Widjaja ET AL.: "Redefining Interleukin 11 as a regeneration-limiting hepatotoxin", bioRxiv, 4 November 2019 (2019-11-04), XP055686015, DOI: 10.1101/830018, Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/830018v1.full.pdf, the whole document

WO-A1-2019238882

WO-A1-2019207122

**(57)** Предложены способы лечения и предупреждения гепатотоксичности путем ингибирования опосредованной интерлейкином-11 (IL-11) передачи сигналов, а также агенты для применения в таких способах.

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки GB 1900811.9, поданной 21 января 2019 г., GB 1907839.3, поданной 3 июня 2019 г., и GB 1915003.6, поданной 17 октября 2019 г., содержание и элементы которых включены в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей.

#### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к диагностике, лечению и профилактике заболеваний и состояний, связанных с гепатотоксичностью.

#### **Уровень техники**

Гепатотоксичность относится к токсическому повреждению печени, в частности, к дисфункции и гибели гепатоцитов в печени. Зачастую это происходит под воздействием химических веществ, например, повреждение или поражение печени, вызванное лекарственным средством, химическими веществами (например, алкоголем) или растительными или биологически активными добавками. Гепатотоксичность также может быть вызвана инфекцией (например, вирусом гепатита), недостаточностью питания или генетическими нарушениями.

Анальгетик ацетаминофен (APAP, N-ацетил-п-аминофенол или парацетамол) является общепринятым средством для снижения жара и боли от легкой до умеренной степени. Передозировка ацетаминофена является распространенной причиной поражения печени и является причиной до 80000 экстренных обращений, 2500 госпитализаций и 500 смертельных интоксикаций в Соединенных Штатах ежегодно (Lee WM. *Hepatology* (2004) 40(1): 6-9; Budnitz DS et al. *Am J Prev Med* (2011) 40(6): 585-92). Кроме того, поражение печени может возникать при хроническом применении ацетаминофена в более низких дозах, особенно при наличии других предрасполагающих факторов, таких как хроническое употребление алкоголя (алкоголизм), голодание, недостаточное питание, ВИЧ-инфекция, инфекция вируса гепатита, рак и лекарственные взаимодействия (McClain et al., *Curr. Gastroenterol. Rep.* 1999; 1: 42-49).

Патофизиология индуцированной ацетаминофеном гепатотоксичности широко изучалась на протяжении многих лет. Повреждение печени после приема ацетаминофена вызвано не самим препаратом, а токсичным метаболитом N-ацетил-п-бензохинониминном (NAPQI), который образуется через группу ферментов цитохрома P450 в печени. NAPQI безвреден при нормальных условиях и удаляется из организма после конъюгации с эндогенным глутатионом. Однако биотрансформация ацетаминофена при передозировке под действием цитохрома P450 (CYP450), преимущественно изоформы CYP2E1, приводит к накоплению избытка NAPQI из-за истощения глутатиона. Это, в свою очередь, вызывает гепатоцеллюлярное поражение и увеличивает гибель клеток (Jollow et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 1973 Oct;187(1): 195-202; Dahlin et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1984 Mar; 81 (5):1327-31; Moore et al., *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 260. No.24, October 25, pp, 13035-13040, 1985; Kyle et al., *Biochemical Pharmacology* Volume 40, issue 6, 15 September 1990). Поражение печени может быть ограничено посредством введения N-ацетилцистеина, который восполняет уровни глутатиона в печени. Необходимы дополнительные терапевтические и профилактические подходы.

Сообщалось, что цитокин интерлейкин-11 (IL-11) оказывает защитное действие в отношении индуцированного ацетаминофеном поражения печени и токсичности (Trepicchio WL et al., *Toxicol Pathol.* 2001; 29(2): 242-9; Nishina T et al., *J Biol Chem.* 2017; 292(1): 205-216). Было показано, что активация пути STAT3 цитокинами, такими как IL-11, способна вызывать компенсаторную пролиферацию гепатоцитов - ключевой элемент регенерации печени, и введение IL-11, среди других активирующих STAT3 цитокинов, предложено в качестве терапевтического подхода при токсичности APAP (Mühl H, *Front Immunol.* 2016 2;7: 163). Nishina T et al., *Sci Signal.* 2012; 5(207): ra5 сообщают, что IL-11 обеспечивает функциональную связь между окислительным стрессом и компенсаторной пролиферацией гепатоцитов, и обнаружили, что агонист рецептора IL-11 усиливал пролиферацию гепатоцитов и уменьшал окислительный стресс при индуцированном ацетаминофеном поражении печени.

Сообщалось также, что лечение IL-11 защищает и/или лечит другие состояния печени, такие как ишемически-реперфузионное повреждение печени (IRI), иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ITP), связанная с хроническим гепатитом C (HrC-ITP), острый эндотоксикоз и опосредованное T-клетками поражение печени (Yu J et al., *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016; 40(5): 562-570; Zhu M et al., *PLoS ONE* 10(5): e0126296; Fontana V et al., *Acta Haematol.* 2008; 119(2): 126-32; Maeshima et al., *Shock.* (2004) 21(2): 134-8; Bozza et al., *Hepatology* (1999) 30(6):1441-7).

#### **Краткое описание изобретения**

В противоположность описанной защитной роли IL-11 при поражении печени, настоящее изобретение относится к лечению и/или предупреждению гепатотоксичности и расстройств, заболеваний или состояний, связанных с гепатотоксичностью, посредством ингибирования передачи сигналов IL-11.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен агент, способный ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения в способе лечения или предупреждения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения при производстве лекарственного средства для применения в способе лечения или предупреждения гепатотоксичности

и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агент, способный предотвращать или снижать связывание интерлейкина-11 (IL-11) с рецептором интерлейкина-11 (IL-11R).

В некоторых вариантах реализации агент способен связываться с интерлейкином-11 (IL-11) или рецептором интерлейкина-11 (IL-11R). В некоторых вариантах реализации агент выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, нуклеиновой кислоты, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы. Агент может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Агент может представлять собой рецептор-ловушку.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антитело к IL-11, являющееся антагонистом опосредованной IL-11 передачи сигналов, или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антитело к IL-11R $\alpha$ , являющееся антагонистом опосредованной IL-11 передачи сигналов, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой рецептор-ловушку для IL-11. В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка для IL-11 содержит: (i) аминокислотную последовательность, соответствующую цитокин-связывающей части gp130, и (ii) аминокислотную последовательность, соответствующую цитокин-связывающей части IL-11R $\alpha$ .

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой мутеин IL-11. В некоторых вариантах реализации мутеин IL-11 представляет собой W147A.

В некоторых вариантах реализации агент способен предотвращать или снижать экспрессию интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора интерлейкина-11 (IL-11R). Агент может представлять собой олигонуклеотид или малую молекулу.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11. В некоторых вариантах реализации антисмысловый олигонуклеотид, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11, представляет собой миРНК, нацеленную на IL11, содержащую последовательность SEQ ID NO: 12, 13, 14 или 15. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11R $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации антисмысловый олигонуклеотид, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11R $\alpha$ , представляет собой миРНК, нацеленную на IL11RA, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16, 17, 18 или 19.

В любых вариантах реализации, предложенных в настоящей заявке, рецептор интерлейкина-11 представляет собой или содержит IL-11R $\alpha$ .

В любых вариантах реализации, предложенных в настоящей заявке, агент может быть введен до, параллельно с или после причины гепатотоксичности, например, введения или потребления гепатотоксического лекарственного средства или воздействия источника гепатотоксичности из окружающей среды.

В любых вариантах реализации, предложенных в настоящей заявке, расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, представляет собой заболевание, при котором патологически вовлечена гепатотоксичность.

В некоторых вариантах реализации заболевание, при котором патологически вовлечена гепатотоксичность, выбрано из: лекарственного поражения печени (DILI), острого поражения печени (ALI), острой печеночной недостаточности, острого заболевания печени, хронического заболевания печени, повреждения печени, гепатита, вирусного гепатита, алкогольного гепатита, ишемического-реперфузионного поражения печени (IRI), тепловой ишемии-реперфузии (WIR), радиационно-индуцированной болезни печени (RILD), идиосинкразического лекарственного поражения печени (IDILI), аутоиммунного поражения печени, холестатического заболевания печени, ВИЧ и рака.

В любых вариантах реализации агенты, применения и способы в настоящей заявке предложены для лечения и/или предупреждения лекарственного поражения печени (DILI). DILI может представлять собой имманентную и/или идиосинкразическую гепатотоксичность. В любых вариантах реализации агенты, применения и способы предложены для лечения и/или предупреждения индуцированной ацетаминофеном (APAP) гепатотоксичности. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает лечение N-ацетилцистеином.

В любых вариантах реализации способ лечения или предупреждения включает введение агента субъекту, у которого повышена экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R).

В любых вариантах реализации способ лечения или предупреждения включает введение агента субъекту, у которого, как было определено, повышена экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора интерлейкина-11 (IL-11R).

В некоторых вариантах реализации способ лечения или предупреждения включает определение то-

го, повышена ли экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R) у субъекта, и введение агента субъекту, у которого повышена экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R).

Также предложен способ определения пригодности субъекта для лечения или предупреждения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, с помощью агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли у указанного субъекта экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R).

Также предложен способ выбора субъекта для лечения или предупреждения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, с помощью агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли у указанного субъекта экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R).

В одном из аспектов предложен способ диагностики гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, или риска развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, у субъекта, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышения интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R) в образце, полученном от указанного субъекта. В некоторых вариантах реализации способ диагностики представляет собой способ подтверждения диагноза гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, у субъекта с подозрением на гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанные с гепатотоксичностью. В некоторых вариантах реализации способ диагностики и/или способ подтверждения диагноза включает выбор субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

Также предложен способ обеспечения прогноза для субъекта, имеющего гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, или подозреваемого на их наличие, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, повышена ли экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R) в образце, полученном от указанного субъекта, и, на основании определения, обеспечение прогноза для лечения указанного субъекта агентом, способным ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов. В некоторых вариантах реализации способ обеспечения прогноза включает выбор субъекта, у которого, как было определено, повышена экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R), для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

В еще одном аспекте предложен способ диагностики гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, или риска развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более генетических факторов у субъекта, прогнозирующих повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или повышение опосредованной IL-11 передачи сигналов. В некоторых вариантах реализации указанный способ включает выбор субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

Также предложен способ обеспечения прогноза для субъекта, имеющего гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, или подозреваемого на их наличие, где способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более генетических факторов у указанного субъекта, прогнозирующих повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или повышение опосредованной IL-11 передачи сигналов.

#### Описание

Существует потребность в эффективном предупреждении и лечении гепатотоксичности, например, гепатотоксичности, являющейся результатом лекарственного поражения печени (DILI). Повреждение печени в результате передозировки цетаминифена (APAP) является распространенной причиной гепатотоксичности.

Неоднократно сообщалось, что цитокин IL-11 оказывает защитное действие при индуцированном APAP повреждении печени и гепатотоксичности в целом. Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов является эффективным для уменьшения индуцированной APAP гепатотоксичности, предлагая тем самым новые терапевтические и/или профилактические подходы к лечению гепатотоксичности.

Интерлейкин-11 и рецепторы IL-11.

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

Интерлейкин-11 (IL-11) экспрессируется в различных типах мезенхимальных клеток. Геномные последовательности IL-11 были картированы на хромосоме 19 и центромерной области хромосомы 7, и

транскрибируются с каноническим сигнальным пептидом, обеспечивающим эффективную секрецию из клеток. Комплекс активаторного белка IL-11, сJun/AP-1, расположенный внутри его промоторной последовательности, имеет решающее значение для регуляции базальной транскрипции IL-11 (Du and Williams., Blood 1997, Vol 89: 3897-3908). Незрелая форма IL-11 человека представляет собой полипептид из 199 аминокислот, тогда как зрелая форма IL-11 кодирует белок из 178 аминокислотных остатков (Garbers and Scheller., Biol. Chem. 2013; 394(9):1145-1161). Аминокислотная последовательность IL-11 человека доступна под номером доступа в UniProt P20809 (P20809.1 GI:124294; SEQ ID NO: 1). Рекомбинантный IL-11 человека (опрелвекин) также коммерчески доступен. Также был клонирован и секвенирован IL-11 от других видов, включая мышью, крысу, свинью, корову, несколько видов костных рыб и приматов.

В данном описании "IL-11" относится к IL-11 от любых видов и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 от любых видов. В предпочтительных вариантах реализации вид представляет собой человека (*Homo sapiens*). Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 необязательно могут быть охарактеризованы как обладающие по меньшей мере 70%, предпочтительно 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью аминокислотной последовательности незрелого или зрелого IL-11 от данного вида, например, человека. Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 могут необязательно характеризоваться способностью связывать IL-11R $\alpha$  (предпочтительно от того же вида) и стимулировать передачу сигналов в клетках, экспрессирующих IL-11R $\alpha$  и gp130 (например, как описано в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11); или Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2):75-80). Фрагмент IL-11 может иметь любую длину (по количеству аминокислот), хотя необязательно может составлять по меньшей мере 25% длины зрелого IL-11 и может иметь максимальную длину, составляющую 50, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% длины зрелого IL-11. Фрагмент IL-11 может иметь минимальную длину 10 аминокислот и максимальную длину 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 195 аминокислот.

IL-11 передает сигналы посредством гомодимера универсально экспрессируемого гликопротеина 130 (gp130; также известного как гликопротеин 130, IL-6ST, IL-6-бета или CD130). Gp130 представляет собой трансмембранный белок, который образует одну субъединицу рецептора цитокинов типа I с семейством рецепторов IL-6. Специфичность достигается за счет индивидуальной альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-11 (IL-11R $\alpha$ ), которая напрямую не участвует в передаче сигналов, хотя первоначальное событие связывания цитокинов с  $\alpha$ -рецептором приводит к образованию конечного комплекса с gp130.

gp130 человека (включая сигнальный пептид из 22 аминокислот) представляет собой белок из 918 аминокислот, а зрелая форма состоит из 866 аминокислот, включая внеклеточный домен из 597 аминокислот, трансмембранный домен из 22 аминокислот и внутриклеточный домен из 277 аминокислот. Внеклеточный домен белка содержит цитокин-связывающую часть (CBM) gp130. CBM gp130 содержит Ig-подобный домен D1 и домены фибронектина III типа D2 и D3 gp130. Аминокислотная последовательность gp130 человека доступна под номером доступа в UniProt P40189-1 (SEQ ID NO: 2).

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

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

В данном описании рецептор IL-11 (IL-11R) относится к полипептиду или полипептидному комплексу, способному связывать IL-11. В некоторых вариантах реализации рецептор IL-11 способен связывать IL-11 и вызывать передачу сигналов в клетках, экспрессирующих указанный рецептор.

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

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

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

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

Передача сигналов IL-11.

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

В принципе, растворимый IL-11R может также образовывать биологически активные растворимые комплексы с IL-11 (Pflanz et al., 1999 FEBS Lett, 450, 117-122), что повышает вероятность того, что, подобно IL-6, IL-11 может в некоторых случаях связывать растворимый IL-11R $\alpha$  до связывания gp130 на клеточной поверхности (см. источник Garbers and Scheller, цитируемый выше). Curtis et al. (Blood 1997 Dec 1; 90 (11): 4403-12) описывают экспрессию альфа-цепи растворимого рецептора IL-11 мыши (sIL-11R) и исследовали передачу сигналов в клетках, экспрессирующих gp130. В присутствии gp130, но не трансмембранного IL-11R, sIL-11R опосредовал IL-11-зависимую дифференцировку клеток лейкоза M1 и пролиферацию в клетках Ba/F3 и ранние внутриклеточные события, включая фосфорилирование gp130, STAT3 и SHP2, схожее с передачей сигналов посредством трансмембранного IL-11R. Недавно была продемонстрирована активация передачи сигналов посредством связанного с клеточной мембраной gp130 с помощью IL-11, связанного с растворимым IL-11R $\alpha$  (Lokau et al., 2016 Cell Reports 14, 1761-1773). Эта так называемая передача транс-сигналов IL-11 может быть важной для патогенеза заболевания, однако ее роль в заболевании человека еще не изучена.

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

Было показано, что опосредованная IL-11 передача сигналов стимулирует гемопоэз и тромбопоэз, стимулирует активность остеокластов, стимулирует нейрогенез, ингибирует адипогенез, снижает экспрессию провоспалительных цитокинов, модулирует метаболизм внеклеточного матрикса (ВКМ) и опосредует нормальный контроль роста клеток эпителия желудочно-кишечного тракта (см. источник Du and Williams, цитируемый выше).

Физиологическая роль интерлейкина-11 (IL-11) остается неясной. IL-11 наиболее тесно связан с активацией гемопоэтических клеток и с продукцией тромбоцитов. Было также показано, что IL-11 обеспечивает защиту от реакции "трансплантат против хозяина", воспалительного артрита и воспалительного заболевания кишечника, вследствие чего IL-11 считается противовоспалительным цитокином (Putoczki and Ernst, J Leukoc Biol 2010, 88(6): 1109-1117). Тем не менее, предполагается, что IL-11 является про-

воспалительным, а также противовоспалительным, проангиогенным и важным для неоплазии. Недавние исследования показали, что IL-11 без труда обнаруживается во время вирус-индуцированного воспаления в мышинной модели артрита и при раке, что дает основания полагать, что экспрессия IL-11 может быть индуцирована патологическими стимулами. IL-11 также связан со Stat3-зависимой активацией опухоль-стимулирующих генов-мишеней в неопластическом желудочно-кишечном эпителии (см. источник Putoczki and Ernst, цитируемый выше).

В контексте настоящего изобретения термин "передача сигналов IL-11" и "опосредованная IL-11 передача сигналов" относится к передаче сигналов, опосредованной связыванием IL-11 или его фрагмента, выполняющего функцию зрелой молекулы IL-11, с рецептором IL-11. Следует понимать, что термин "передача сигналов IL-11" и "опосредованная IL-11 передача сигналов" относится к передаче сигналов, инициированной IL-11/его функциональным фрагментом, например, посредством связывания с рецептором IL-11. "Передача сигналов", в свою очередь, относится к сигнальной трансдукции и другим клеточным процессам, регулирующим клеточную активность.

Гепатотоксичность.

Аспекты настоящего изобретения относятся к диагностике, лечению и профилактике гепатотоксичности и расстройств, заболеваний и состояний, характеризующихся гепатотоксичностью.

В контексте настоящего изобретения термин "гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью" относится к гепатотоксичности, расстройству, связанному с гепатотоксичностью, заболеванию, связанному с гепатотоксичностью, или состоянию, связанному с гепатотоксичностью.

В контексте настоящего изобретения гепатотоксичность относится к повреждению и/или гибели клеток/ткани печени. Гепатотоксичность может относиться к состоянию токсического повреждения печени, в частности, к гибели гепатоцитов в печени. Гепатотоксичность может быть определена/диагностирована путем обнаружения одного или более коррелятов гепатотоксичности, как описано ниже.

Гепатотоксичность может возникнуть вследствие гепатотоксического поражения. В контексте настоящего изобретения термин "гепатотоксическое поражение" относится к любому лечению, событию или состоянию, вызывающим гепатотоксичность. Например, гепатотоксическое поражение может быть вызвано химическим/физическим лечением/воздействием или газообразной смесью. В некоторых вариантах реализации гепатотоксическое поражение является химическим, например, в случае лекарственного поражения печени, например, индуцированной АРАР гепатотоксичности. В некоторых вариантах реализации гепатотоксическое поражение является физическим, например, в случае гепатотоксичности, являющейся результатом хирургического повреждения ткани печени, которое может возникнуть, например, при хирургическом вмешательстве для лечения заболевания и/или для трансплантации печени (например, гепатотоксичность может иметь ятрогенные причины). В некоторых вариантах реализации гепатотоксическое поражение возникает в результате гипоксии, например, вследствие ишемии, или может быть результатом реперфузии (например, гепатотоксическое поражение может быть вызвано IRI).

Гепатотоксичность может представлять собой вызванное химическими веществами повреждение печени, например, повреждение или поражение, вызванное лекарственным средством, химическим веществом, ишемией, реперфузией, сепсисом или растительными или биологически активными добавками. В некоторых вариантах реализации гепатотоксичность относится к лекарственному поражению печени (DILI). В некоторых вариантах реализации гепатотоксичность относится к поражению печени, вызванному гепатотоксином. Гепатотоксин может представлять собой алкоголь. Гепатотоксичность может также называться токсическим гепатитом. Гепатотоксичность может относиться к острой и/или хронической гепатотоксичности.

Гепатотоксичность может быть вызвана, прямо или косвенно, употреблением алкоголя, например, хроническим употреблением алкоголя. Гепатотоксичность в контексте настоящего изобретения, может быть вызвана, прямо или косвенно, голоданием, недостаточностью питания, инфекцией, вызванной инфекционным агентом (например, вирусом гепатита (например, гепатита А, В, С, D или Е), ВИЧ), раком или лекарственными взаимодействиями.

Гепатотоксичность может иметь место в сочетании с другими расстройствами, заболеваниями и состояниями. Нарушения, заболевания или состояния, связанные с гепатотоксичностью, включают острое поражение печени (ALI), острую печеночную недостаточность, острое заболевание печени, хроническое заболевание печени, повреждение печени, гепатит, например, вирусный гепатит, алкогольный гепатит, ишемическое-реперфузионное поражение печени (IRI), например, "тепловую" ишемию-реперфузию (WIR), радиационно-индуцированную болезнь печени (RILD), лекарственное поражение печени (DILI), аутоиммунное поражение печени, холестатическое заболевание печени, ВИЧ и рак.

Лекарственное поражение печени (DILI) включает имманентную и идиосинкразическую гепатотоксичность, а идиосинкразическая DILI дополнительно включает аллергическую и неаллергическую реакцию. Имманентный механизм связан с дозозависимой гепатотоксичностью, тогда как идиосинкразическая гепатотоксичность не зависит от дозы и может возникать непредсказуемым образом. Аллергическая идиосинкразическая гепатотоксичность дополнительно характеризуется наличием симптомов и призна-



агенты, способные ингибировать передачу сигналов JAK/STAT. В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать передачу сигналов JAK/STAT, способны ингибировать действие JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B и/или STAT6. Например, агенты могут быть способны ингибировать активацию белков JAK/STAT, ингибировать взаимодействие белков JAK или STAT с рецепторами клеточной поверхности, например, IL-11R $\alpha$  или gp130, ингибировать фосфорилирование белков JAK, ингибировать взаимодействие между белками JAK и STAT, ингибировать фосфорилирование белков STAT, ингибировать димеризацию белков STAT, ингибировать транслокацию белков STAT в ядро клетки, ингибировать связывание белков STAT с ДНК и/или способствовать деградации белков JAK и/или STAT. В некоторых вариантах реализации ингибитор JAK/STAT выбран из руксолитиниба (Jakafi/Jakavi; Incyte), тофацитиниба (Xeljanz/Jakvinus; NIH/Pfizer), олацитиниба (Apoquel), барицитиниба (Olumiant; Incyte/Eli Lilly), филготиниба (G-146034/GLPG-0634; Galapagos NV), гандотииниба (LY-2784544; Eli Lilly), лестауртиниба (CEP-701; Teva), момелотиниба (GS-0387/CYT-387; Gilead Sciences), пакритиниба (SB1518; CTI), PF-04965842 (Pfizer), упадацитиниба (ABT-494; AbbVie), пефицининиба (ASP015K/JNJ-54781532; Astellas), федратиниба (SAR302503; Celgene), кукурбитацина I (JSI-124) и CHZ868.

В некоторых вариантах реализации в способах согласно настоящему изобретению используются агенты, способные ингибировать передачу сигналов MAPK/ERK. В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать передачу сигналов MAPK/ERK, способны ингибировать действие GRB2, ингибировать действие киназы RAF, ингибировать действие белков MEK, ингибировать активацию MAP3K/MAP2K/MAPK и/или Мус, и/или ингибировать фосфорилирование белков STAT. В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать передачу сигналов ERK, способны ингибировать p42/44 ERK. В некоторых вариантах реализации ингибитор ERK выбран из SCH772984, SC1, VX-11e, DEL-22379, сорафениба (Nexavar; Bayer/Onyx), SB590885, PLX4720, XL281, RAF265 (Novartis), энкорафениба (LGX818/Braftovi; Array BioPharma), дабрафениба (Tafinlar; GSK), вемурафениба (Zelboraf; Roche), кобиметиниба (Cotellic; Roche), CI-1040, PD0325901, биниметиниба (MEK162/MEKTOVI; Array BioPharma), селуметиниба (AZD6244; Array/AstraZeneca) и траметиниба (GSK1120212/Mekinist; Novartis). В некоторых вариантах реализации в способах согласно настоящему изобретению используются агенты, способные ингибировать передачу сигналов/активность N-концевой киназы c-Jun (JNK). В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать передачу сигналов/активность JNK, способны ингибировать действие и/или фосфорилирование JNK (например, JNK1, JNK2). В некоторых вариантах реализации ингибитор JNK выбран из SP600125, CEP 1347, TCS JNK 60, пептида c-JUN, SU3327, AEG 3482, TCS JNK 5a, BI78D3, IQ3, SR3576, IQ1S, JIP-1 (153-163) и дигидрохлорида CC401.

В настоящих примерах авторы изобретения демонстрируют, что экспрессия и активность NOX4 повышается путем передачи сигналов посредством IL-11/IL-11R $\alpha$ /gp130. NOX4 является НАДФН-оксидазой и источником активных форм кислорода (АФК). Экспрессия Nox4 повышена у трансгенных мышей со специфичной для гепатоцитов экспрессией IL11, и первичные гепатоциты человека, стимулированные IL11, повышают экспрессию NOX4.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении используются агенты, способные ингибировать экспрессию (экспрессию гена или белка) или функцию NOX4. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении используются агенты, способные ингибировать опосредованную IL-11 активацию экспрессии/функции NOX4. Агенты, способные ингибировать экспрессию или функцию NOX4, могут называться в настоящей заявке ингибиторами NOX4. Например, ингибитор NOX4 может быть способен снижать экспрессию (например, экспрессию гена и/или белка) NOX4, снижать уровень РНК, кодирующей NOX4, снижать уровень белка NOX4 и/или снижать уровень активности NOX4 (например, снижать опосредованную NOX4 активность НАДФН-оксидазы и/или опосредованную NOX4 выработку АФК).

Ингибиторы NOX4 включают NOX4-связывающие молекулы и молекулы, способные снижать экспрессию NOX4. NOX4-связывающие ингибиторы включают пептиды/аптамеры нуклеиновых кислот, антитела (и фрагменты антител) и фрагменты партнеров по взаимодействию NOX4, которые ведут себя как антагонисты функции NOX4, и низкомолекулярные ингибиторы NOX4. Молекулы, способные снижать экспрессию NOX4, включают антисмысловую РНК (например, миРНК, мшРНК) к NOX4. В некоторых вариантах реализации ингибитор NOX4 выбран из ингибитора NOX4, описанного в Antioxid Redox Signal. (2015) 23(5): 406-427 или Augsburg et al., Redox Biol. (2019) 26: 101272, такого как GKT137831.

Связывающие агенты.

В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, могут связываться с IL-11. В некоторых вариантах реализации агенты, способные ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, могут связываться с рецептором IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R $\alpha$  и/или gp130). Связывание таких агентов может ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов за счет снижения/предотвращения способности IL-11 связываться с рецепторами IL-11, тем самым ингибируя нисходящую передачу сигналов. Связывание таких агентов может ингибировать опосредованную IL-11 передачу цис- и/или транс-сигналов за

счет уменьшения/предотвращения способности IL-11 связываться с рецепторами IL-11, например, IL-11R $\alpha$  и/или gp130, тем самым ингибируя нисходящую передачу сигналов. Агенты могут связываться с транс-сигнальными комплексами, такими как IL-11 и растворимый IL-11R $\alpha$ , и ингибировать опосредованную gp130 передачу сигналов.

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

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты.

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

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

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

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

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

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

Антитела, способные связываться с IL-11, включают, например, моноклональное антитело мыши против IL-11 человека, клон № 22626; № по каталогу MAB218 (R&D Systems, MN, USA), использованное, например, в Vockhorn et al. Nat. Commun. (2013) 4(0):1393, клон 6D9A (Abbiotec), клон KT8 (Abbiotec), клон M3103F11 (BioLegend), клон 1F1 (Abnova Corporation), клон 3C6 (Abnova Corporation), клон GF1 (LifeSpan Biosciences), клон 13455 (Source BioScience), 11h3/19.6.1 (Hermann et al., Arthritis Rheum. (1998) 41(8): 1388-97), AB-218-NA (R&D Systems), X203 (Ng et al., Sci Transl Med. (2019) 11(511) pii: eaaw1237) и антитела к IL-11, раскрытые в US 2009/0202533 A1, WO 99/59608 A2 и WO 2018/109174 A2.

В частности, было показано, что клон 22626 антитела к IL-11 (также известный как MAB218) является антагонистом опосредованной IL-11 передачи сигналов, например, в Schaefer et al., Nature (2017) 552(7683): 110-115. В Hermann et al., Arthritis Rheum. (1998) 41 (8): 1388-97 раскрыто, что моноклональное антитело 11h3/19.6.1 представляет собой нейтрализующий IgG1 к IL-11. AB-218-NA от R&D Systems, использованное, например, в работе McCoy et al., BMC Cancer (2013) 13: 16, является еще одним примером нейтрализующего антитела к IL-11. В WO 2018/109174 A2 раскрыты дополнительные иллюстративные антитела к IL-11, являющиеся антагонистами опосредованной IL-11 передачи сигналов.

Антитела, способные связываться с IL-11R $\alpha$ , включают, например, моноклональное антитело, клон 025 (Sino Biological), клон EPR5446 (Abcam), клон 473143 (R&D Systems), клоны 8E2, 8D10 и 8E4 и варианты 8E2 с созревшей аффинностью, описанные в US 2014/0219919 A1, моноклональные антитела, описанные в Blanc et al. (*J. Immunol Methods*. 2000 Jul 31;241(1-2): 43-59), X209 (Widjaja et al., *Gastroenterology* (2019) 157 (3) 777-792), антитела, раскрытые в WO 2014121325 A1 и US 2013/0302277 A1, и антитела к IL-11R $\alpha$ , раскрытые в US 2009/0202533 A1, WO 99/59608 A2 и WO 2018/109170 A2.

В частности, было показано, что клон 473143 антитела к IL-11R $\alpha$  (также известный как MAB1977) является антагонистом опосредованной IL-11 передачи сигналов, например, в Schaefer et al., *Nature* (2017) 552(7683): 110-115. В US 2014/0219919 A1 приведены последовательности клонов антител к IL-11R $\alpha$  человека, 8E2, 8D10 и 8E4, и раскрыта их способность антагонизировать опосредованную IL-11 передачу сигналов - см., например, [0489]-[0490] в US 2014/0219919 A1. Кроме того, в US 2014/0219919 A1 приведена информация о последовательности дополнительных 62 вариантов клона 8E2 с созревшей аффинностью, для 61 из которых показан антагонизм опосредованной IL-11 передачи сигналов - см. табл. 3 в US 2014/0219919 A1. В WO 2018/109170 A2 раскрыты дополнительные иллюстративные антитела к IL-11R $\alpha$ , являющиеся антагонистами опосредованной IL-11 передачи сигналов.

Специалисту хорошо известны методики получения антител, подходящих для терапевтического применения у данного вида/субъекта. Например, процедуры получения антител, подходящих для терапевтического применения у людей, описаны в источнике Park and Smolen *Advances in Protein Chemistry* (2001) 56: 369-421 (полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки).

Антитела к данному белку-мишени (например, IL-11 или IL-11R $\alpha$ ) могут быть выращены у модельных видов (например, грызунов, зайцеобразных) и впоследствии генетически модифицированы с целью улучшения их пригодности для терапевтического применения у данного вида/субъекта. Например, одна или более аминокислот моноклональных антител, вырабатываемых путем иммунизации модельных видов, могут быть заменены для получения последовательности антитела, которая более схожа с зародышевыми последовательностями иммуноглобулина человека (тем самым снижая потенциал иммунных ответов против ксеногенного антитела у субъекта-человека, получающего лечение таким антителом). Модификации в вариабельных доменах антитела могут быть сконцентрированы в каркасных областях, чтобы сохранить паратоп антитела. Гуманизация антител является рутинной практикой в области технологии антител и рассматривается, например, в Almagro and Fransson, *Frontiers in Bioscience* (2008) 13: 1619-1633, Safdari et al., *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (2013) 29(2): 175-186 и Lo et al., *Microbiology Spectrum* (2014) 2(1), все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Необходимость в гуманизации можно преодолеть путем выработки антител к данному белку-мишени (например, IL-11 или IL-11R $\alpha$ ) у трансгенных модельных видов, экспрессирующих гены иммуноглобулинов человека, так что антитела, выработанные у таких животных, являются полностью человеческими (как описано, например, в Brüggemann et al., *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (2015) 63(2): 101-108, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки).

Для идентификации антител к данному белку-мишени (например, IL-11 или IL-11R $\alpha$ ) также могут быть использованы методы фагового дисплея, которые хорошо известны специалисту. Использование фагового дисплея для идентификации полностью человеческих антител к белкам-мишеням человека рассмотрено например, в Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.* (2005) 23, 1105-1116 и Chan et al., *International Immunology* (2014) 26(12): 649-657, полностью включенных в настоящую заявку посредством ссылки.

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

IL-11- или IL-11R $\alpha$ -связывающие антитела могут быть оценены на способность антагонизировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, например, с использованием анализа, описанного в US 2014/0219919 A1 или Blanc et al. (*J. Immunol Methods*. 2000 Jul 31;241(1-2): 43-59). Вкратце, IL-11- и IL-11R $\alpha$ -связывающие антитела могут быть оценены *in vitro* на способность ингибировать пролиферацию клеток Ba/F3, экспрессирующих IL-11R $\alpha$  и gp130, от соответствующих видов, в ответ на стимуляцию IL-11 от соответствующих видов. В качестве альтернативы, IL-11- и IL-11R $\alpha$ -связывающие антитела могут быть проанализированы *in vitro* на способность ингибировать переход фибробласта в миофибробласт после стимуляции фибробластов с помощью TGF $\beta$ 1, путем оценки экспрессии  $\alpha$ SMA (как описано, например, в WO 2018/109174 A2 (пример 6) и WO 2018/109170 A2 (пример 6), Ng et al., *Sci Transl Med.* (2019) 11(511) pii: eaaw1237 и Widjaja et al., *Gastroenterology* (2019) 157(3)777-792).

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

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

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

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

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

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

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

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

Антитела могут быть получены в процессе созревания аффинности, при котором генерируется модифицированное антитело, обладающее улучшенной аффинностью антитела к антигену по сравнению с немодифицированным родительским антителом. Антитела с созревшей аффинностью могут быть получены с помощью методик, известных в данной области техники, например, Marks et al., *Rio/Technology* 10: 779-783 (1992); Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7): 331 0-159 (1995); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

Антитела/фрагменты включают в себя биспецифичные антитела, например, состоящие из двух разных фрагментов двух разных антител, так что биспецифичное антитело связывает два типа антигена. Биспецифичное антитело содержит антитело/фрагмент, как описано в настоящей заявке, способные связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11. Антитело может содержать другой фрагмент, имеющий аффинность ко второму антигену, который может представлять собой любой желаемый антиген. Способы получения биспецифичных антител хорошо известны в данной области техники, например, см. Mueller, D et al., (2010 *Biodrugs* 24 (2): 89-98), Wozniak-Knopf G et al., (2010 *Protein Eng Des* 23 (4): 289-297), и Baeuerle, PA et al., (2009 *Cancer Res* 69 (12): 4941-4944). Биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты могут быть предоставлены в любом подходящем формате, таком как форматы, описанные в источнике Kontermann *MAbs* 2012, 4 (2): 182-197, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки. Например, биспецифичное антитело или биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой конъюгат биспецифичного антитела (например, IgG2, F(ab')<sub>2</sub> или CovX-Body), биспецифичное IgG или IgG-подобную молекулу (например, IgG, scFv4-Ig, IgG-scFv, scFv-IgG, DVD-Ig, IgG-sVD, sVD-IgG, 2 in 1-IgG, mAb2 или тандемное

антитело с общей LC), ассиметричное биспецифичное IgG или IgG-подобную молекулу (например, IgG kih (выступ-во-впадину), IgG kih с общей LC, CrossMab, IgG-scFab kih, mAb-Fv, заряженную пару или SEED-тело), малую молекулу биспецифичного антитела (например, диатело (Db), dsDb, DART, scDb, тандемные диатела, тандемный scFv (taFv), тандемное dAb/VHH, триатело, triple head, Fab-scFv или F(ab')<sub>2</sub>-scFv2), биспецифичный слитый белок Fc и CH3 (например, taFv-Fc, Di-диатело, scDb-CH3, scFv-Fc-scFv, HCAb-VHH, scFv-kih-Fc или scFv-kih-CH3), или биспецифичный слитый белок (например, scFv2-альбумин, scDb-альбумин, taFv-токсин, DNL-Fab3, DNL-Fab4-IgG, DNL-Fab4-IgG-цитокин2). См., в частности, фиг. 2 в Kontermann MAbs 2012, 4(2): 182-19.

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

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

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

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

Рецепторы-ловушки.

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

В некоторых вариантах реализации связывающий агент может содержать IL-11-связывающий фрагмент цепи IL-11R $\alpha$  и предпочтительно может быть растворимым и/или не содержать один или более, или все трансмембранные домены. В некоторых вариантах реализации связывающий агент может содержать IL-11-связывающий фрагмент gp130 и предпочтительно может быть растворимым и/или не содержать один или более, или все трансмембранные домены. Такие молекулы могут быть описаны как рецепторы-ловушки. Связывание таких агентов может ингибировать опосредованную IL-11 передачу цис- и/или транс-сигналов за счет уменьшения/предотвращения способности IL-11 связываться с рецепторами IL-11, например, IL-11R $\alpha$  или gp130, тем самым ингибируя нисходящую передачу сигналов.

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

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

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

2018/109168 A1, полностью включенных в настоящую заявку посредством ссылки.

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

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

В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка IL-11 может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей цитокин-связывающей части gp130. В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка IL-11 может содержать аминокислотную последовательность, соответствующую цитокин-связывающей части IL-11R $\alpha$ . В настоящей заявке аминокислотная последовательность, "соответствующая" референсной области или последовательности данного пептида/полипептида, обладает по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью аминокислотной последовательности референсной области/последовательности.

В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка может быть способен связывать IL-11, например, с аффинностью связывания по меньшей мере 100 мкМ или менее, необязательно 10 мкМ или менее, 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее или приблизительно от 1 до 100 нМ. В некоторых вариантах реализации рецептор-ловушка может содержать весь или часть IL-11-связывающего домена и может необязательно быть лишенным всех или части трансмембранных доменов. Рецептор-ловушка может быть необязательно слит с константной областью иммуноглобулина, например, с областью Fc IgG.

#### Ингибиторы.

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

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

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

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

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

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

#### Аптамеры.

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

аптамер, идентифицированный до настоящего времени, является не встречающейся в природе молекулой.

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

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

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

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

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

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

Свойства IL-11-связывающих агентов.

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

- специфичное связывание с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11;
- связывание с IL-11/комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11, с  $K_D$  10 мкМ или менее, предпочтительно  $\leq 5$  мкМ,  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 500$  нМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ или  $\leq 100$  пМ;
- ингибирование взаимодействия между IL-11 и IL-11R $\alpha$ ;
- ингибирование взаимодействия между IL-11 и gp130;
- ингибирование взаимодействия между IL-11 и рецепторным комплексом IL-11R $\alpha$ :gp130;
- ингибирование взаимодействия между рецепторным комплексом IL-11:IL-11R $\alpha$  и gp130.

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

Например, подходящим отрицательным контролем для анализа способности тестируемого антитела/антигенсвязывающего фрагмента связываться с IL-11/комплексом, содержащим IL-11/рецептором IL-11 может быть антитело/антигенсвязывающий фрагмент, направленные против нецелевого белка (т.е. антитело/антигенсвязывающий фрагмент, которые не являются специфичными для IL-11/комплекса, содержащего IL-11/рецептора IL-11). Подходящим положительным контролем может быть известное, подтвержденное (например, коммерчески доступное) антитело, связывающееся с IL-11 или рецептором IL-

11. Контроли могут иметь тот же изотип, что и предполагаемые анализируемые антите-ло/антигенсвязывающий фрагмент, связывающие IL-11/комплекс, содержащий IL-11/рецептор IL-11, и могут, например, иметь такие же константные области.

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

В некоторых вариантах реализации агент может связываться с IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, с большей аффинностью, чем аффинность связывания с одним или более другими членами семейства цитокинов IL-6 (например, IL-6, лейкоз-ингибирующим фактором (LIF), онкостатином M (OSM), кардиотрофином-1 (CT-1), цилиарным нейротрофическим фактором (CNTF) и кардиотрофин-подобным цитокином (CLC)). В некоторых вариантах реализации агент может связываться с рецептором IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R $\alpha$  и/или gp130) с большей аффинностью, чем аффинность связывания с одним или более другими членами семейства рецепторов IL-6. В некоторых вариантах реализации агент может связываться с IL-11R $\alpha$  с большей аффинностью, чем аффинность связывания с одним или более из IL-6R $\alpha$ , рецептора лейкоз-ингибирующего фактора (LIFR), рецептора онкостатина M (OSMR), рецептора альфа цилиарного нейротрофического фактора (CNTFR $\alpha$ ) и подобный цитокиновому рецептору фактор 1 (CRLF1).

В некоторых вариантах реализации степень связывания связывающего агента с нецелевым объектом составляет менее чем приблизительно 10% от связывания агента с мишенью, согласно измерениям, например, с помощью ELISA, SPR, биослойной интерферометрии (BLI), микроскопического термофереза (MST) или радиоиммуноанализа (RIA). В качестве альтернативы, специфичность связывания может быть отражена в терминах аффинности связывания, где связывающий агент связывается с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11 с  $K_D$ , составляющей по меньшей мере 0,1 порядка величины (т.е.  $0,1 \times 10^n$ , где  $n$  - целое число, представляющее собой порядок величины) больше, чем  $K_D$  по отношению к другой нецелевой молекуле. Необязательно, она может составлять по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 или 2,0.

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

В некоторых вариантах реализации агент способен связываться с IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, или с рецептором IL-11 с  $K_D$  50 мкМ или менее, предпочтительно  $\leq 10$ ,  $\leq 5$ ,  $\leq 4$ ,  $\leq 3$ ,  $\leq 2$ ,  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 500$ ,  $\leq 100$ ,  $\leq 75$ ,  $\leq 50$ ,  $\leq 40$ ,  $\leq 30$ ,  $\leq 20$ ,  $\leq 15$ ,  $\leq 12,5$ ,  $\leq 10$ ,  $\leq 9$ ,  $\leq 8$ ,  $\leq 7$ ,  $\leq 6$ ,  $\leq 5$ ,  $\leq 4$ ,  $\leq 3$ ,  $\leq 2$ ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 500$ ,  $\leq 400$ ,  $\leq 300$ ,  $\leq 200$  или  $\leq 100$  пМ.

В некоторых вариантах реализации агент связывается с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11 с аффинностью связывания (например, согласно ELISA)  $EC_{50} = 10000$  нг/мл или менее, предпочтительно  $\leq 5000$ ,  $\leq 1000$ ,  $\leq 900$ ,  $\leq 800$ ,  $\leq 700$ ,  $\leq 600$ ,  $\leq 500$ ,  $\leq 400$ ,  $\leq 300$ ,  $\leq 200$ ,  $\leq 100$ ,  $\leq 90$ ,  $\leq 80$ ,  $\leq 70$ ,  $\leq 60$ ,  $\leq 50$ ,  $\leq 40$ ,  $\leq 30$ ,  $\leq 20$ ,  $\leq 15$ ,  $\leq 10$ ,  $\leq 7,5$ ,  $\leq 5$ ,  $\leq 2,5$  или  $\leq 1$  нг/мл. Такие ELISA могут быть проведены, например, как описано в *Antibody Engineering*, vol.1 (2<sup>nd</sup> Edn), Springer Protocols, Springer (2010), Part V, pp 657-665.

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

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

Связывающий агент, способный ингибировать отдельно взятое взаимодействие (например, между IL-11 и IL-11R $\alpha$ , или между IL-11 и gp130, или между IL-11 и IL-11R $\alpha$ :gp130, или между IL-11: IL-11R $\alpha$  и gp130) идентифицируют по наблюдению уменьшения/снижения уровня взаимодействия между партне-

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

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

Ингибирование взаимодействия между IL-11 или комплексом, содержащим IL-11, и рецептором IL-11 может быть проанализировано с помощью анализов включения <sup>3</sup>H-тимидина и/или анализов пролиферации клеток Ba/F3, таких как описанные, например, в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) и Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80. Клетки Ba/F3 совместно экспрессируют IL-11R $\alpha$  и gp130.

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

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

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

В некоторых вариантах реализации связывающий агент может быть способен ингибировать взаи-

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

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

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

Экспрессия может представлять собой экспрессию гена или белка и может быть определена, как описано в настоящей заявке, или способами в данной области техники, хорошо известными специалисту в данной области техники. Экспрессия может осуществляться клеткой/тканью/органом/системой органов субъекта.

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

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

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

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

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

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

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

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

Так как последовательности нуклеиновых кислот для IL-11, IL-11R $\alpha$  и gp130 известны (например, известных последовательностей мРНК, доступных в GenBank под номерами доступа: BC012506.1 GI: 15341754 (IL-11 человека), BC134354.1 GM26632002 (IL-11 мыши), AF347935.1 GM3549072 (IL-11 крысы), NM\_001142784.2 GI: 391353394 (IL-11R $\alpha$  человека), NM\_001163401.1 GI: 254281268 (IL-11R $\alpha$  мыши), NM\_139116.1 GI: 20806172 (IL-11R $\alpha$  крысы), NM\_001190981.1 GI: 300244534 (gp130 человека), NM\_010560.3 GI: 225007624 (gp130 мыши), NM\_001008725.3 GI: 300244570 (gp130 крысы)), олигонуклеотиды могут быть сконструированы с возможностью подавления или сайленсинга экспрессии IL-11, IL-

11R $\alpha$  или gp130.

Такие олигонуклеотиды могут иметь любую длину, но предпочтительно могут быть короткими, например, менее 100 нуклеотидов, например, 10-40 нуклеотидов или 20-50 нуклеотидов, и могут содержать нуклеотидную последовательность, обладающую полной или почти комплементарностью (например, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарностью) последовательности нуклеотидов соответствующей длины в олигонуклеотиде-мишени, например, мРНК IL-11, IL-11R или gp130. Комплементарная область нуклеотидной последовательности может иметь любую длину, но предпочтительно имеет по меньшей мере 5 и, необязательно, не более 50 нуклеотидов в длину, например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов.

Подавление экспрессии IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130 предпочтительно будет приводить к снижению количества IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, экспрессируемого клеткой/тканью/органом/системой органов/субъектом. Например, в отдельно взятой клетке подавление IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130 путем введения подходящей нуклеиновой кислоты приведет к уменьшению количества IL-11, IL-11R $\alpha$  или gp130, экспрессируемого этой клеткой, относительно необработанной клетки. Подавление может быть частичным. Предпочтительные степени подавления составляют по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80, 85 или 90%. Уровень подавления от 90 до 100% считается "сайленсингом" экспрессии или функции.

Была продемонстрирована роль механизма РНКи и малых РНК в нацеливании на гетерохроматиновые комплексы и эпигенетический сайленсинг генов в определенных хромосомных локусах. Зависимый от двухцепочечной РНК (дцРНК) посттранскрипционный сайленсинг, также известный как РНК-интерференция (РНКи), представляет собой явление, при котором комплексы дцРНК могут нацеливаться на определенные гомологичные гены для сайленсинга в течение короткого периода времени. Он действует как сигнал к индукции деградации мРНК, обладающей идентичностью последовательности. 20-нуклеотидные миРНК, как правило, имеют достаточную длину, чтобы вызвать ген-специфичный сайленсинг, но являются достаточно короткими, чтобы избежать ответа хозяина. Снижение экспрессии продуктов генов-мишеней может быть значительным при 90% сайленсинге, вызванном несколькими молекулами миРНК. Терапия на основе РНКи прошла клинические испытания I, II и III фазы по ряду показаний (Nature 2009 Jan 22; 457(7228): 426-433).

В данной области техники эти последовательности РНК называют "короткими или малыми интерферирующими РНК" (миРНК) или "микроРНК" (мкРНК) в зависимости от их происхождения. Оба типа последовательностей могут быть использованы для подавления экспрессии генов путем связывания с комплементарными РНК и либо инициации удаления мРНК (РНКи), либо остановки трансляции мРНК в белок. миРНК получают путем процессинга длинных двухцепочечных РНК, и встречающиеся в природе миРНК обычно имеют экзогенное происхождение. Микроинтерферирующие РНК (мкРНК) представляют собой эндогенно кодируемые малые некодирующие РНК, полученные путем процессинга коротких шпилек. Как миРНК, так и мкРНК могут ингибировать трансляцию мРНК, несущих частично комплементарные последовательности-мишени, без расщепления РНК, и разрушать мРНК, несущие полностью комплементарные последовательности.

Лиганды миРНК, как правило, являются двухцепочечными, и для оптимизации эффективности опосредованного РНК подавления функции гена-мишени предпочтительно, чтобы длина молекулы миРНК была выбрана для обеспечения правильного распознавания миРНК комплексом RISC, который опосредует распознавание миРНК мишени мРНК, и чтобы миРНК была достаточно короткой, чтобы уменьшить ответ хозяина.

Лиганды мкРНК обычно являются одноцепочечными и имеют области, которые являются частично комплементарными, что позволяет лигандам образовывать шпильку. мкРНК представляют собой гены РНК, которые транскрибируются с ДНК, но не транслируются в белок. Последовательность ДНК, кодирующая ген мкРНК, длиннее, чем мкРНК. Эта последовательность ДНК включает последовательность мкРНК и приблизительный обратный комплемент. Когда эта последовательность ДНК транскрибируется в молекулу одноцепочечной РНК, последовательность мкРНК и основания ее обратного комплемента спариваются с образованием частично двухцепочечного сегмента РНК. Конструирование последовательностей микроРНК обсуждается в источнике John et al., PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004.

Как правило, лиганды РНК, предназначенные для имитации действий миРНК или мкРНК, имеют от 10 до 40 рибонуклеотидов (или их синтетических аналогов), более предпочтительно от 17 до 30 рибонуклеотидов, более предпочтительно от 19 до 25 рибонуклеотидов и наиболее предпочтительно от 21 до 23 рибонуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения, где используется двухцепочечная миРНК, молекула может иметь симметричные 3'-липкие концы, например, один или два (рибо)нуклеотида, обычно UU dTdT 3'-липкий конец. На основании приведенного в настоящей заявке описания специалист может легко разработать подходящие последовательности миРНК и мкРНК, например, используя такие ресурсы, как Ambion siRNA finder. Последовательности миРНК и мкРНК могут быть получены синтетически и добавлены экзогенно, чтобы вызвать подавление гена, или получены с исполь-

зованием систем экспрессии (например, векторов). В предпочтительном варианте реализации миРНК синтезируют синтетически.

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

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

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

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

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

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

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

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

В качестве альтернативы, молекулы мРНК могут быть синтезированы с использованием стандартных методик твердофазного или жидкофазного синтеза, известных в данной области техники. Связи между нуклеотидами могут представлять собой фосфодиэфирные связи или альтернативы, например, связывающие группы формулы P(O)S, (тиоэфир); P(S)S, (дитиоэфир); P(O)NR<sup>2</sup>; P(O)R'; P(O)OR<sub>6</sub>; CO; или CONR<sup>2</sup>, где R представляет собой H (или соль) или алкил (1-12C), а R<sub>6</sub> представляет собой алкил (1-9C), присоединенный к соседним нуклеотидам через -O-или -S-.

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

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

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

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

В данной области техники известны способы, относящиеся к применению РНКи для сайленсинга генов у *C. elegans*, *Drosophila*, растений и млекопитающих (Fire A, et al., 1998 Nature 391: 806-811; Fire, A. Trends Genet. 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. RNA interference 2001. Genes Dev. 15, 485-490 (2001); Hammond, S. M., et al., Nature Rev. Genet. 2, 110-1119 (2001); Tuschl, T. Chem. Biochem. 2, 239-245 (2001); Hamilton, A. et al., Science 286, 950-952 (1999); Hammond, S. M., et al., Nature 404, 293-296 (2000); Zamore, P. D., et al., Cell 101, 25-33 (2000); Bernstein, E., et al., Nature 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M., et al., Genes Dev. 15, 188-200 (2001); WO 0129058; WO 9932619, и Elbashir S M, et al., 2001 Nature 411: 494-498).

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

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

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

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

В качестве альтернативы, нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК (обычно двухцепо-

чечную ДНК), которая при транскрипции в клетке млекопитающего дает РНК, имеющую две комплементарные части, соединенные спейсером, так что РНК принимает форму шпильки, когда комплементарные части гибридизуются друг с другом. В клетке млекопитающего шпилечная структура может быть отщеплена от молекулы ферментом DICER с получением двух разных, но гибридизованных молекул РНК.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации нуклеиновая кислота в целом нацелена на последовательность с одной из SEQ ID NO: 4-7 (IL-11) или на одну из SEQ ID NO: 8-11 (IL-11R $\alpha$ ).

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

Соответственно, изобретение относится к нуклеиновой кислоте, способной, когда она подходящим образом введена в клетку млекопитающего, которая в противном случае экспрессирует IL-11 или IL-11R $\alpha$ , или экспрессирована в ней, подавлять экспрессию РНКи, где нуклеиновая кислота в целом нацелена на последовательность одной из SEQ ID NO: 4-7 или 8-11.

Под "в целом нацеленной" подразумевается, что нуклеиновая кислота может быть нацелена на последовательность, которая перекрывается с SEQ ID NO: 4-7 или 8-11. В частности, нуклеиновая кислота может быть нацелена на последовательность в мРНК IL-11 или IL-11R человека, которая немного длиннее или короче, чем одна из SEQ ID NO: 4-7 или 8-11 (предпочтительно длиной 17-23 нуклеотида), но в остальном идентична одной из SEQ ID NO: 4-7 или 8-11.

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

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

В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота (называемая в настоящей заявке двухцепочечной миРНК) включает последовательности двухцепочечной РНК, представленные в SEQ ID NO: 12-15. В еще одном варианте реализации нуклеиновая кислота (называемая в настоящей заявке двухцепочечной миРНК) включает последовательности двухцепочечной РНК, представленные в SEQ ID NO: 16-19.

Однако также ожидается, что несколько более короткие или более длинные последовательности, направленные в одну и ту же область мРНК IL-11 или IL-11R $\alpha$ , также будут эффективными. В частности, ожидается, что двухцепочечные последовательности длиной от 17 до 23 п. н. также будут эффективными.

Нити, образующие двухцепочечную РНК, могут иметь короткие 3'-динуклеотидные липкие концы, которые могут представлять собой ДНК или РНК. Использование 3'-липкого конца ДНК не влияет на активность миРНК по сравнению с 3'-липким концом РНК, но снижает стоимость химического синтеза цепей нуклеиновой кислоты (Elbashir et al., 2001c). По этой причине динуклеотиды ДНК могут быть предпочтительными.

Динуклеотидные липкие концы, когда они присутствуют, могут быть симметричны друг другу, хотя это не является обязательным. И действительно, 3'-липкий конец смысловой (верхней) цепи не влияет на активность РНКи, так как он не участвует в распознавании и деградации мРНК (Elbashir et al., 2001a, 2001b, 2001c).

Хотя эксперименты с РНКи на *Drosophila* показывают, что антисмысловые 3'-липкие концы могут участвовать в распознавании и нацеливании мРНК (Elbashir et al. 2001c), 3'-липкие концы, по-видимому не являются необходимыми для активности РНКи миРНК в клетках млекопитающих. Поэтому считается, что неправильный отжиг 3'-липких концов оказывает незначительное влияние на клетки млекопитающих (Elbashir et al. 2001c; Czauderna et al. 2003).

Поэтому в антисмысловой цепи миРНК может быть использован любой динуклеотидный липкий конец. Тем не менее, динуклеотид предпочтительно представляет собой -UU или -UG (или -TT или -TG, если липкий конец представляет собой ДНК), более предпочтительно -UU (или -TT). Динуклеотидный липкий конец -UU (или -TT) наиболее эффективен и согласуется с (т.е. способен образовывать часть) сигналом терминации транскрипции РНК-полимеразой III (сигнал терминатора представляет собой

TTTTT). Соответственно, этот динуклеотид является наиболее предпочтительным. Динуклеотиды AA, CC и GG также могут быть использованы, но они менее эффективны и, следовательно, менее предпочтительны.

Более того, 3'-липкие концы могут быть полностью исключены из миРНК.

Изобретение также относится к одноцепочечным нуклеиновым кислотам (называемым в настоящей заявке одноцепочечными миРНК), соответственно состоящим из цепи-компонента одной из вышеупомянутых двухцепочечных нуклеиновых кислот, предпочтительно с 3'-липкими концами, но необязательно без них. Изобретение также относится к наборам, содержащим пары таких одноцепочечных нуклеиновых кислот, которые способны гибридизоваться друг с другом *in vitro* с образованием вышеупомянутых двухцепочечных миРНК, которые затем могут быть введены в клетки.

Изобретение также относится к ДНК, которая при транскрипции в клетке млекопитающего дает РНК (также называемую в настоящей заявке мшРНК), имеющую две комплементарные части, способные к самогибридизации с образованием двухцепочечного мотива, например, включающего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-15 или 16-19, или последовательности, которая отличается от любой из вышеупомянутых последовательностей заменой одной пары оснований.

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

Предпочтительно, 5'-конец спейсера (расположенный непосредственно с 3'-конца от расположенной против хода транскрипции комплементарной части) состоит из нуклеотидов -UU-или -UG-, опять же, предпочтительно -UU- (хотя, опять же, использование этих конкретных динуклеотидов не является существенным). Подходящим спейсером, рекомендованным для применения в системе pSuper от OligoEngine (Сиэтл, штат Вашингтон, США), является UUCAAGAGA. В этом и других случаях концы спейсера могут гибридизоваться друг с другом, например, вытягивая двухцепочечный мотив за пределы точных последовательностей SEQ ID NO: 12-15 или 16-19 на небольшое число (например, 1 или 2) пар оснований.

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

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

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

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

Особенно подходящими являются коммерчески доступные системы pSuper и pSuperior от OligoEngine (Сиэтл, штат Вашингтон, США). В них использован промотор полимеразы III (H1) и последовательность терминатора транскрипции T5, которая вносит два остатка U на 3'-конец транскрипта (которые после процессинга посредством DICER обеспечивают 3'-III-липкий конец одной цепи миРНК).

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

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

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

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

Аналогичным образом изобретение, кроме того, относится к способу лечения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, включающему введение субъекту двухцепочечной миРНК согласно изобретению или транскрипционного вектора согласно изобретению.

Изобретение, кроме того, относится к двухцепочечным миРНК согласно изобретению и транскрип-

ционными векторам согласно изобретению для применения в способе лечения, предпочтительно в способе лечения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

Изобретение, кроме того, относится к применению двухцепочечных миРНК согласно изобретению и транскрипционных векторов согласно изобретению для получения лекарственного средства для лечения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

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

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

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

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

Общие обзоры: Borkhardt, A. 2002. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment? *Cancer Cell*. 2: 167-8. Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature*. 418: 244-51. McManus, M.T., and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*. 3: 737-47. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder. 2003b. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem*. 10: 245-56. Shuey, D.J., D.E. McCallus, and T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov Today*. 7: 1040-6.

Системная доставка с использованием липосом: Lewis, D.L., J.E. Hagstrom, A.G. Loomis, J.A. Wolff, and H. Herweijer. 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet*. 32: 107-8. Paul, C.P., P.D. Good, I. Winer, and D.R. Engelke. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol*. 20: 505-8. Song, E., S.K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar, and J. Lieberman. 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*. 9: 347-51. Sorensen, D.R., M. Leirdal, and M. Sioud. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol*. 327: 761-6.

Вирус-опосредованный перенос: Abbas-Terki, T., W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralong, and P. Aebischer. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther*. 13: 2197-201. Barton, G.M., and R. Medzhitov. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 14943-5. Devroe, E., and P.A. Silver. 2002. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol*. 2: 15. Lori, F., P. Guallini, L. Galluzzi, and J. Lisziewicz. 2002. Gene therapy approaches to HIV infection. *Am J Pharmacogenomics*. 2: 245-52. Matta, H., B. Hozayev, R. Tomar, P. Chugh, and P.M. Chaudhary. 2003. Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. *Cancer Biol Ther*. 2: 206-10. Qin, X.F., D.S. An, I.S. Chen, and D. Baltimore. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 183-8. Scherr, M., K. Battmer, A. Ganser, and M. Eder. 2003a. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle*. 2: 251-7. Shen, C., A.K. Buck, X. Liu, M. Winkler, and S.N. Reske. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett*. 539: 111-4.

Доставка пептидов: Morris, M.C., L. Chaloin, F. Heitz, and G. Divita. 2000. Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol*. 11: 461-6. Simeoni, F., M.C. Morris, F. Heitz, and G. Divita. 2003. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 31: 2717-24. Другие технологии, которые могут быть подходящими для доставки миРНК в клетки-мишени, основаны на наночастицах или нанокапсулах, таких как описанные в патентах США № 6649192В и 5843509В.

Ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов.

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

ингибирование передачи сигналов, опосредованной IL-11;

ингибирование передачи сигналов, опосредованной связыванием IL-11 с рецепторным комплексом IL-11R $\alpha$ : gp130;

ингибирование передачи сигналов, опосредованной связыванием комплекса IL-11: IL-11R $\alpha$  с gp130

(т.е. передачи транс-сигналов IL-11);

ингибирование процесса, опосредованного IL-11;

ингибирование экспрессии генов/белков IL-11, IL-11R $\alpha$  и/или gp130.

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

Опосредованная IL-11 передача сигналов и/или процессы, опосредованные IL-11, включают передачу сигналов, опосредованную фрагментами IL-11 и полипептидными комплексами, содержащими IL-11 или его фрагменты. Опосредованная IL-11 передача сигналов может представлять собой передачу сигналов, опосредованную IL-11 человека и/или IL-11 мыши. Опосредованная IL-11 передача сигналов может происходить после связывания IL-11 или комплекса, содержащего IL-11, с рецептором, с которым связывается IL-11 или указанный комплекс.

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

В некоторых вариантах реализации агент является антагонистом одного или более сигнальных путей, которые активируются передачей сигналов посредством рецепторов, содержащих IL-11R $\alpha$  и/или gp130, например, IL-11R $\alpha$ : gp130. В некоторых вариантах реализации агент способен ингибировать передачу сигналов посредством одного или более иммунных рецепторных комплексов, содержащих IL-11R $\alpha$  и/или gp130, например, IL-11R $\alpha$ : gp130. В различных аспектах настоящего изобретения агент, предложенный в настоящей заявке, способен ингибировать опосредованную IL-11 передачу цис- и/или транс-сигналов. В некоторых вариантах реализации в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения агент, предложенный в настоящей заявке, способен ингибировать опосредованную IL-11 цис-передачу сигналов.

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

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

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

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

В некоторых вариантах реализации комплекс IL-11: IL-11R $\alpha$  может быть связан с клеткой, например, комплекс связанного с клеточной мембраной IL-11R $\alpha$  и IL-11. Передача сигналов, опосредованная связыванием комплекса IL-11: IL-11R $\alpha$  с gp130, может быть проанализирована путем обработки клеток, экспрессирующих gp130, комплексом IL-11: IL-11R $\alpha$ , например, рекомбинантным слитым белком, содержащим IL-11, соединенный пептидным линкером с внеклеточным доменом IL-11R $\alpha$ , например, hyper IL-11. Hyper IL-11 конструировали с использованием фрагментов IL-11R $\alpha$  (аминокислотные остатки с 1 по 317, состоящие из домена с 1 по 3; UniProtKB: Q14626) и IL-11 (аминокислотные остатки с 22 по 199 из UniProtKB: P20809) с линкером из 20 аминокислот (SEQ ID NO: 20). Аминокислотная последовательность Hyper IL-11 представлена в SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать передачу сигналов,

опосредованную связыванием комплекса IL-11: IL-11R $\alpha$  с gp130, и также способен ингибировать передачу сигналов, опосредованную связыванием IL-11 с рецептором IL-11R $\alpha$ : gp130.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать процесс, опосредованный IL-11.

В некоторых вариантах реализации агент может быть способен ингибировать экспрессию генов/белков IL-11 и/или IL-11R $\alpha$ . Экспрессия генов и/или белков может быть измерена, как описано в настоящей заявке, или способами в данной области техники, хорошо известными специалисту в данной области техники.

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

Лечение/предупреждение гепатотоксичности.

Настоящее изобретение относится к способам и изделиям (агентам и композициям) для лечения/предупреждения гепатотоксичности и расстройств, заболеваний и состояний, связанных с гепатотоксичностью, например, как описано в настоящей заявке. Также предложены способы лечения/предупреждения гепатотоксичности и расстройств, заболеваний и состояний, связанных с гепатотоксичностью, например, как описано в настоящей заявке.

Лечение осуществляется путем ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов (т.е. антагонизма опосредованной IL-11 передачи сигналов). То есть, настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению гепатотоксичности и расстройств, заболеваний и состояний, связанных с гепатотоксичностью, посредством ингибирования опосредованной IL-11 передачи сигналов, например, в клетке, ткани/органе/системе органов/организме субъекта. В некоторых вариантах реализации ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов согласно настоящему изобретению включает ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов в клетках печени (например, гепатоцитах).

Предложен агент, способный ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения в способе лечения или предупреждения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

Также предложено применение агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, для применения при производстве лекарственного средства для применения в способе лечения или предупреждения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

Кроме того, предложен способ лечения или предупреждения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению патологии, связанной с гепатотоксичностью, при заболевании/состоянии. То есть, настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению заболевания/состояния, при котором патологически вовлечена гепатотоксичность. Патология, связанная с гепатотоксичностью, описана в настоящей заявке.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что терапевтическое и профилактическое применение настоящего изобретения распространяется, по существу, на заболевание/состояние, на которое окажет благоприятное действие снижение гепатотоксичности и/или патологии, связанной с гепатотоксичностью. Терапевтическое и профилактическое применение настоящего изобретения распространяется на любого субъекта, страдающего гепатотоксичностью и/или расстройством, заболеванием или состоянием, связанным с гепатотоксичностью. Терапевтическое и профилактическое применение настоящего изобретения также распространяется на любого субъекта, страдающего заболеванием, при котором имеет место патология, связанная с гепатотоксичностью.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению заболеваний/состояний, которые вызваны/усугубляются гепатотоксичностью. В некоторых вариантах реализации предложено лечение/предупреждение заболеваний/состояний у субъекта, у которого гепатотоксичность обуславливает плохой прогноз.

В некоторых вариантах реализации гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, подлежащее лечению/предупреждению, может характеризоваться одним или более из следующего в пораженном органе/ткани/организме субъекта, например, по

сравнению с нормальными, не пораженными органом/тканью/организмом субъекта (т.е. не пораженными гепатотоксичностью и/или расстройством, заболеванием или состоянием, связанным с гепатотоксичностью):

- сниженная функция печени;
  - повышенная сывороточная концентрация печеночных ферментов, таких как аланинаминотрансфераза (АЛТ/SGPT), лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и/или аспартатаминотрансфераза (АСТ/SGOT);
  - отношение АСТ/АЛТ более 0,5, более 1 или более 2;
  - повышенные уровни щелочной фосфатазы (ЩФ) в крови;
  - повышенные уровни гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ);
  - повышенная сывороточная концентрация цитокинов, таких как TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  и IFN $\gamma$ ;
  - сниженные уровни сывороточного альбумина;
  - увеличение общего билирубина (неконъюгированного (непрямого) и конъюгированного (прямого)), например, в контексте референтных диапазонов, описанных в VanWagner LB, JAMA. 313 (5): 516-517, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки;
  - потеря массы печени;
  - повышенное образование актиновых стресс-волокон гепатоцитов;
  - повышенный центролобулярный некроз (т.е. некроз центролобулярной ткани печеночной дольки).
- Характеристики, перечисленные в предыдущем абзаце, также могут называться в настоящей заявке симптомами/коррелятами гепатотоксичности.

Референсные уровни для лабораторных анализов печени можно найти, например, в Gowda S et al., Pan Afr Med J. 2009; 3: 17, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, подлежащее лечению/предупреждению, может характеризоваться увеличением одного или более из следующих в органе/ткани/организме субъекта, пораженных гепатотоксичностью и/или расстройством, заболеванием или состоянием, связанным с гепатотоксичностью, например, по сравнению с нормальными органом/тканью/организмом субъекта (т.е., без гепатотоксичности или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью): экспрессия одного или более из IL-11 и IL-11R $\alpha$ .

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению гепатотоксичности в контексте заболевания/расстройства/состояния, связанного с гепатотоксичностью, например, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению гепатотоксичности и первопричинного заболевания/расстройства/состояния, связанного с гепатотоксичностью. Например, ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов полезно для антагонизма роли IL-11 при гепатотоксичности, связанной с химиотерапией, а также для антагонизма роли IL-11 при самом раке.

Лечение/предупреждение гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, согласно настоящему изобретению может проводиться в отношении гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, связанной с активацией IL-11, например, активацией IL-11 в клетках или тканях, в которых проявляются или могут возникнуть симптомы заболевания/расстройства/состояния, или активацией внеклеточного IL-11 или IL-11R $\alpha$ .

Расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, может поражать любую ткань, или орган, или систему органов. В некоторых вариантах реализации заболевание/расстройство/состояние может поражать несколько тканей/органов/систем органов. В некоторых вариантах реализации заболевание/расстройство/состояние поражает печень.

В некоторых вариантах реализации расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, поражает одно или более из: сердечно-сосудистой системы, пищеварительной системы, выделительной системы, дыхательной системы, почечной системы, репродуктивной системы, кровеносной системы, мышечной системы, эндокринной системы, экзокринной системы, лимфатической системы, иммунной системы, нервной системы и/или костной системы.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению патологии, связанной с гепатотоксичностью, при остром поражении печени (ALI), острой печеночной недостаточности, остром заболевании печени, хроническом заболевании печени, повреждении печени, гепатите, например, вирусном гепатите, алкогольном гепатите, ишемическом-реперфузионном поражении печени (IRI), например, "тепловой" ишемии-реперфузии (WIR), радиационно-индуцированной болезни печени (RILD), лекарственном поражении печени (DILI), идиосинкразическом лекарственном поражении печени (IDILI), аутоиммунном поражении печени, холестагическом заболевании печени, ВИЧ и раке.

Лечение может быть эффективным для предупреждения прогрессирования гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, например, для уменьшения/задержки/предотвращения ухудшения, или для уменьшения/задержки/предотвращения раз-

вития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью. В некоторых вариантах реализации лечение может приводить к улучшению, например, уменьшению тяжести и/или обращению вспять симптомов гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью. В некоторых вариантах реализации лечение может увеличить выживаемость. В некоторых вариантах реализации лечение является эффективным для обращения вспять эффектов и/или симптомов гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

В частности, авторы изобретения продемонстрировали, что с помощью антагонизма опосредованной IL-11 передачи сигналов можно уменьшить симптомы (т.е. обратить вспять) гепатотоксичности, острой печеночной недостаточности (ALF) и смертности, связанной с ALF.

Предупреждение может относиться к предупреждению развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, и/или предупреждению ухудшения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, например, предупреждению прогрессирования гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, до более поздней или хронической стадии.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению гепатотоксичности в контексте трансплантации печени. Антагонист опосредованной IL-11 передачи сигналов может быть введен субъекту-донору до сбора трансплантата для минимизации повреждения трансплантата. Антагонист опосредованной IL-11 передачи сигналов может быть введен субъекту-донору до и/или после сбора трансплантата для лечения/предупреждения гепатотоксичности у субъекта-донора. Антагонист опосредованной IL-11 передачи сигналов может быть введен субъекту-реципиенту до и/или после трансплантации для лечения/предупреждения гепатотоксичности у субъекта-реципиента. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение может быть эффективным для улучшения приживления трансплантата/уменьшения отторжения трансплантата.

В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения способ лечения и/или предупреждения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, согласно настоящему изобретению может включать одно или более из следующего:

- снижение повреждения ткани печени;
- снижение гибели гепатоцитов;
- снижение опосредованной IL-11 передачи сигналов в гепатоцитах;
- снижение активации CASP3 в печени;
- повышение функции печени;
- снижение сывороточного уровня АЛТ;
- снижение сывороточного уровня АСТ;
- повышение уровня GSH в печени;
- снижение острой печеночной недостаточности;
- снижение фульминантной печеночной недостаточности;
- снижение смертности, связанной с острой печеночной недостаточностью;
- увеличение массы печени;
- регенерация ткани печени;
- снижение активации (т.е. фосфорилирования) ERK и/или JNK в печени;
- снижение экспрессии провоспалительных генов/белков в печени;
- снижение экспрессии гена/белка NOX4;
- снижение выработки АФК в печени;
- повышение экспрессии генов/белков PCNA, циклина D1, циклина D3 и/или циклина E1 в печени;
- повышение активации (фосфорилирования) Rb в печени.

В настоящем изобретении также предложены агенты, способные ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов для применения с целью: снижения повреждения ткани печени, снижения гибели гепатоцитов, снижения опосредованной IL-11 передачи сигналов в гепатоцитах, снижения активации CASP3 в печени, повышения функции печени; снижения сывороточного уровня АЛТ; снижения сывороточного уровня АСТ; повышения уровня GSH в печени; снижения острой печеночной недостаточности; снижения фульминантной печеночной недостаточности; снижения смертности, связанной с острой печеночной недостаточностью; увеличения массы печени; регенерации ткани печени; снижения активации (т.е. фосфорилирования) ERK и/или JNK в печени; снижения экспрессии провоспалительных генов/белков в печени; снижения экспрессии гена/белка NOX4; снижения выработки АФК в печени; повышения экспрессии генов/белков PCNA, циклина D1, циклина D3 и/или циклина E1 в печени; и/или повышения активации (фосфорилирования) Rb в печени.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к лечению/предупреждению острого поражения печени (ALI), острой печеночной недостаточности, острого заболевания печени, хронического заболевания печени, повреждения печени, гепатита, например, вирусного гепатита, алкогольного гепатита, ишемического-реперфузионного поражения печени (IRI), например, "тепловой" ишемии-реперфузии (WIR), радиационно-индуцированной болезни печени (RILD), лекарственного поражения

печени (DILI), идиосинкразического лекарственного поражения печени (IDILI), аутоиммунного поражения печени, холестатического заболевания печени, ВИЧ и рака.

"Рак" в контексте настоящего изобретения может представлять собой любую нежелательную клеточную пролиферацию (или любое заболевание, проявляющееся в нежелательной клеточной пролиферации), новообразование или опухоль, или повышенный риск развития или предрасположенность к развитию нежелательной клеточной пролиферации, новообразования или опухоли. Рак может быть доброкачественным или злокачественным и может быть первичным или вторичным (метастатическим). Новообразование или опухоль могут представлять собой любой патологический рост или пролиферацию клеток и могут быть расположены в любой ткани. Примеры тканей включают надпочечник, мозговое вещество надпочечника, анус, аппендикс, мочевой пузырь, кровь, кость, костный мозг, головной мозг, молочную железу, слепую кишку, центральную нервную систему (включая или исключая головной мозг), мозжечок, шейку матки, ободочную кишку, двенадцатиперстную кишку, эндометрий, эпителиальные клетки (например, почечный эпителий), желчный пузырь, пищевод, глиальные клетки, сердце, подвздошную кишку, тощую кишку, почку, слезную железу, гортань, печень, легкое, лимфу, лимфатический узел (включая абдоминальный лимфатический узел, подмышечный лимфатический узел, шейный лимфатический узел, паховый лимфатический узел, медиастинальный лимфатический узел, тазовый лимфатический узел, периаортальный лимфатический узел), лимфобласт, челюсть, средостение, брыжейку, миометрий, носоглотку, сальник, полость рта, яичник, поджелудочную железу, околоушную железу, периферическую нервную систему, брюшину, плевру, предстательную железу, слюнную железу, сигмовидную ободочную кишку, кожу, тонкий кишечник, мягкие ткани, селезенку, желудок, семенник, вилочковую железу, щитовидную железу, язык, миндалину, трахею, матку, вульву, лейкоциты.

Рак может быть определенного типа. Примеры типов рака включают астроцитому, карциному (например, аденокарциному, гепатоклеточную карциному, медуллярную карциному, папиллярную карциному, плоскоклеточную карциному), глиому, лимфому, медуллобластому, меланому, миелому, менингиому, нейробластому, саркому (например, ангиосаркому, хондросаркому, остеосаркому).

"Рак" в контексте настоящего изобретения может включать любой один или более из следующего: острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), рак надпочечников, рак анального канала, рак мочевого пузыря, рак крови, рак костей, опухоль головного мозга, рак молочной железы, рак женской репродуктивной системы, рак мужской репродуктивной системы, лимфома центральной нервной системы, рак шейки матки, рабдомиосаркома у детей, саркома у детей, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), рак ободочной кишки и прямой кишки, рак ободочной кишки, рак эндометрия, саркома эндометрия, рак пищевода, рак глаза, рак желчного пузыря, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоклеточный рак, болезнь Ходжкина, гипофарингеальный рак, саркома Капоши, рак почки, рак гортани, лейкоз, лейкоз, рак печени, рак легкого, злокачественная фиброзная гистиоцитома, злокачественная тимома, меланома, мезотелиома, множественная миелома, миелома, рак носовой полости и околоносовых пазух, рак носоглотки, рак нервной системы, нейробластома, неходжкинская лимфома, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркома, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак парашитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, опухоль гипофиза, плазмноклеточная опухоль, первичная лимфома ЦНС, рак предстательной железы, рак прямой кишки, респираторной системы, ретинобластома, рак слюнных желез, рак кожи, рак тонкой кишки, саркома мягких тканей, рак желудка, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак мочевыводящих путей, саркома матки, рак влагалища, сосудистой системы, макроглобулинемия Вальденстрёма и опухоль Вильмса.

В частных вариантах реализации настоящее изобретение относится к предупреждению гепатотоксичности. В некоторых вариантах реализации ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов обеспечивается для защиты от гепатотоксичности до гепатотоксического поражения (которое может быть, например, физическим и/или химическим). Ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов до гепатотоксического поражения может уменьшить один или более симптомов гепатотоксичности после гепатотоксического поражения.

В частных вариантах реализации настоящее изобретение относится к лечению гепатотоксичности. В некоторых вариантах реализации ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов обеспечивается для снижения гепатотоксичности после гепатотоксического поражения (которое может быть, например, физическим, связанным с перфузией и/или химическим). Ингибирование опосредованной IL-11 передачи сигналов после гепатотоксического поражения может уменьшить один или более симптомов гепатотоксичности.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение относится к агенту, способному ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, для применения в комбинации с другим терапевтическим/профилактическим вмешательством для лечения/предупреждения гепатотоксичности (например, лекарственного поражения печени, например, индуцированной АРАР гепатотоксичности). Терапевтическое/профилактическое вмешательство при передозировке АРАР (и, как следствие, индуцированной АРАР гепатотоксичности) рассматривается, например, в источнике Park et al., *BMJ Clin Evid.* (2015) 2015: 2101, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки.

Такие вмешательства включают в себя лечение/процедуры, направленные на минимизацию поглощения АРАР из желудочно-кишечного тракта после проглатывания. Такое лечение/процедуры включают промывание желудка, введение рвотного средства или введение активированного угля.

Дальнейшие вмешательства включают лечение/процедуры, направленные на поддержание/повышение уровней глутатиона. Такое лечение/процедуры включают введение ацетилцистеина (например, N-ацетилцистеина; NAC), метионина, цистеамина или кальцитриола.

Дополнительные вмешательства включают лечение/процедуры, направленные на обеспечение субъекта функциональной тканью печени, например, после или в предвидении печеночной недостаточности. Такое лечение/процедуры включают трансплантацию печени.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту, способному ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, для применения в способе лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности у субъекта, где способ включает введение (i) агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и (ii) еще одного (другого) агента, пригодного для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности, указанному субъекту. Также предложена комбинация (например, композиция), содержащая: агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и еще один (другой) агент, пригодный для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности, для применения в способе лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности у субъекта, где способ включает введение указанной комбинации указанному субъекту.

Также предложено применение агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, при производстве лекарственного средства для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности у субъекта, где способ включает введение (i) агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и (ii) еще одного (другого) агента, пригодного для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности, указанному субъекту. Также предложено применение комбинации (например, композиции), содержащей: агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и еще один (другой) агент, пригодный для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности, при производстве лекарственного средства для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности у субъекта, где способ включает введение указанной комбинации указанному субъекту.

Также предложен способ лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности у субъекта, где способ включает введение (i) агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и (ii) еще одного (другого) агента, пригодного для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности, указанному субъекту. Также предложен способ лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности у субъекта, включающий введение комбинации (например, композиции), содержащей: (i) агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и (ii) еще один (другой) агент, пригодный для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности, указанному субъекту.

В некоторых вариантах реализации в соответствии с аспектами, описанными в настоящей заявке, агент, пригодный для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности (кроме агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов), выбран из: ацетилцистеина (например, NAC), метионина, цистеамина, кальцитриола, рвотного средства или активированного угля. В частных вариантах реализации агент, пригодный для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности (кроме агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов), представляет собой ацетилцистеин (например, NAC).

В некоторых вариантах реализации аспекты, в которых используется агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и еще один (другой) агент, пригодный для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности, обеспечивают улучшенный лечебный эффект по сравнению с эффектом, наблюдаемым при применении любого из агентов в отдельности (т.е. в качестве монотерапии). В некоторых вариантах реализации аспекты, в которых используется агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и еще один (другой) агент, пригодный для лечения/предупреждения индуцированной АРАР гепатотоксичности, достигают синергетического (т.е. супераддитивного) эффекта лечения по сравнению с эффектом, наблюдаемым при использовании любого из агентов в отдельности.

### Введение

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

В некоторых вариантах реализации агент может быть введен до, параллельно с или после гепатотоксического поражения (т.е. причины гепатотоксичности). В некоторых вариантах реализации гепатотоксическое поражение является химическим, например, представляет собой введение или потребление гепатотоксического агента (например, гепатотоксического лекарственного средства, например, АРАР). В некоторых вариантах реализации причина гепатотоксичности является физической, например, представляет собой физическое повреждение клеток/ткани печени, например, в результате хирургического вмешательства, ишемии/реперфузии или физического повреждения. В некоторых вариантах реализации гепатотоксическое поражение является источником гепатотоксичности в окружающей среде.

В некоторых вариантах реализации агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, вводят до гепатотоксического поражения. Агент может быть введен в предвидении гепатотоксического поражения. Агент может быть введен для предотвращения/снижения гепатотоксичности в результате последующего гепатотоксического поражения. В некоторых вариантах реализации агент вводят в пределах определенного времени до гепатотоксического поражения. В некоторых вариантах реализации агент вводят в пределах 1 недели до гепатотоксического поражения, например, в пределах 72, 60, 48, 36, 24, 16, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1 ч или 30 мин до гепатотоксического поражения.

В некоторых вариантах реализации агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, вводят одновременно с (т.е. в одно и то же время с) гепатотоксическим поражением. Агент может быть введен для предупреждения/снижения гепатотоксичности в результате гепатотоксического поражения. В некоторых вариантах реализации агент вводят в одно и то же время с гепатотоксическим поражением, например, в пределах 6, 4, 2, 1 ч или 30 мин до/после гепатотоксического поражения.

В некоторых вариантах реализации агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, вводят после гепатотоксического поражения. Агент может быть введен для предупреждения/снижения гепатотоксичности в результате предшествующего гепатотоксического поражения. Агент может быть введен после возникновения гепатотоксичности. Агент может быть введен после обнаружения коррелята гепатотоксичности. В некоторых вариантах реализации агент вводят в пределах определенного времени после гепатотоксического поражения. В некоторых вариантах реализации агент вводят в пределах 1 месяца после гепатотоксического поражения, например, в пределах 3, 2, 1 недели, 6, 5, 4 дней, 72, 60, 48, 36, 24, 16, 12, 8, 6, 4, 2, 1 ч или 30 мин после гепатотоксического поражения. В некоторых вариантах реализации агент вводят более чем через 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60, 72 ч, 4, 5, 6 дней, 1, 2, 3 недели или 1 месяц после гепатотоксического поражения.

В частных вариантах реализации гепатотоксическое поражение представляет собой введение/потребление гепатотоксического агента. В некоторых вариантах реализации гепатотоксический агент представляет собой химическое вещество, которое прямо или косвенно вызывает гепатотоксичность. В некоторых вариантах реализации гепатотоксический агент представляет собой ацетаминофен.

В некоторых вариантах реализации агент вводят в пределах 48, 36, 24, 16, 12, 8, 6, 4, 2, 1 ч или 30 мин после передозировки ацетаминофена. В некоторых вариантах реализации агент вводят более чем через 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 или 48 ч после передозировки ацетаминофена.

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

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

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

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

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

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

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

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

В некоторых случаях изделие (например, агент/композицию), как описано в настоящей заявке, вводят для лечения, как описано в настоящей заявке, параллельно с лечением заболевания/расстройства/состояния, связанного с гепатотоксичностью. Подходящие методы лечения заболевания/расстройства/состояния, связанного с гепатотоксичностью, известны в данной области техники. Композиция может быть введена по отдельности или в сочетании с другими видами лечения, либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от подлежащего лечению заболевания/расстройства/состояния. Например, изделие может быть введено до, одновременно или после лечения. Изделие и лечение могут быть включены в состав одного препарата, например, препарата, описанного выше, или включены в состав отдельных препаратов.

В некоторых вариантах реализации в соответствии с аспектами, где используется комбинация агентов, агенты могут быть введены одновременно или последовательно. Одновременное введение относится к введению в виде композиции, содержащей оба агента (комбинированный препарат), или непосредственно друг за другом и необязательно с помощью одного и того же способа введения, например, в одну и ту же артерию, вену или другой кровеносный сосуд. Последовательное введение относится к введению одного из агентов с последующим отдельным введением другого агента через определенный промежуток времени. Не требуется введение двух агентов одним и тем же способом, хотя в некоторых вариантах реализации его осуществляют именно так. Временной интервал может представлять собой любой временной интервал.

Обнаружение IL-11 и рецепторов IL-11.

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

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

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

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

В некоторых вариантах реализации можно считать, что активация IL-11 или рецептора IL-11 (на-

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

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

Например, подходящие методики включают способ определения уровня IL-11 или рецептора IL-11 в образце путем приведения образца в контакт с агентом, способным связывать IL-11 или рецептор IL-11, и обнаружения образования комплекса агента и IL-11 или рецептора IL-11. Агент может представлять собой любую подходящую связывающую молекулу, например, антитело, полипептид, пептид, олигонуклеотид, аптамер или малую молекулу, и может быть необязательно помечен для обеспечения возможности обнаружения, например, визуализации образованных комплексов. Подходящие метки и средства для их обнаружения хорошо известны специалистам в данной области техники и включают флуоресцентные метки (например, флуоресцеин, родамин, эозин и NDB (нитробензоксадиазол), зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), хелаты редкоземельных элементов, таких как европий (Eu), тербий (Tb) и самарий (Sm), тетраметилродамин, тexasский красный, 4-метилумбеллиферон, 7-амино-4-метилкумарин, Cy3, Cy5), изотопные маркеры, радиоизотопы (например,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ), хемилюминесцентные метки (например, сложный эфир акридиния, люминол, изолуминол), ферменты (например, пероксидазу, щелочную фосфатазу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, люциферазу), антитела, лиганды и рецепторы. Методики обнаружения хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть выбраны таким образом, чтобы они соответствовали метящему агенту. Подходящие методики включают ПЦР-амплификацию олигонуклеотидных меток, масс-спектрометрию, детекцию флуоресценции или цвета, например, при ферментативном превращении субстрата репортерным белком, или детекцию радиоактивности.

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

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

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

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

В некоторых предпочтительных вариантах реализации образец может представлять собой образец ткани, например, биоптат, взятый из ткани печени, сердечной ткани, ткани внутреннего органа, ткани органа дыхательной системы или ткани мочевыделительной/почечной системы. Образец может содержать клетки.

Субъект может быть выбран для терапии/профилактики согласно настоящему изобретению на основании определения, что у субъекта повышен уровень экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 (например, IL-11R, gp130 или комплекса, содержащего IL-11R $\alpha$  и/или gp130). Повышенная экспрессия IL-11 или рецептора IL-11 может служить маркером гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, подходящего для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

Активация может осуществляться в данной ткани или в отдельных клетках данной ткани. Предпочтительной тканью может быть ткань печени. Повышение экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 может также быть определено в циркулирующей жидкости, например, в крови, или в образце, полученном из крови. Активация может осуществляться в отношении внеклеточного IL-11 или IL-11R $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации экспрессия может быть повышена локально или системно.

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

Диагностика и прогноз.

Выявление повышения экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 (например, IL-11R $\alpha$ , gp130 или комплекса, содержащего IL-11R $\alpha$  и/или gp130) также может быть использовано в способе диагностики гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, идентификации субъекта, подверженного риску развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, и в способах прогнозирования или предсказания ответа субъекта на лечение агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

"Развитие" и другие формы этого слова могут относиться к возникновению расстройства/заболевания или продолжению или прогрессированию расстройства/заболевания.

В некоторых вариантах реализации субъект может иметь подозрение на наличие гепатотоксичности или страдать от гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, например, на основании наличия других симптомов, свидетельствующих о гепатотоксичности и/или расстройстве, заболевании или состоянии, связанном с гепатотоксичностью, в организме субъекта или в отдельных клетках/тканях организма субъекта, или субъект может считаться подверженным риску развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, например, из-за генетической предрасположенности или воздействия факторов окружающей среды, которые, как известно, являются факторами риска гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью. Определение повышения экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 может подтвердить диагноз или предполагаемый диагноз, или может подтвердить, что субъект подвержен риску развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью. Посредством определения также возможно диагностировать гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, или предрасположенность как подходящие для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

Таким образом, может быть предложен способ обеспечения прогноза для субъекта, имеющего гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, или подозреваемого на их наличие, где способ включает определение, повышена ли экспрессия IL-11 или рецептора IL-11 в образце, полученном от указанного субъекта, и на основании определения - обеспечение прогноза лечения указанного субъекта агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

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

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

Некоторые способы могут включать определение наличия одного или более ОНП, связанных с секцией IL-11, или предрасположенности к развитию гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью. ОНП обычно являются биаллельными и, следовательно, могут быть легко определены с использованием одного из ряда обычных анализов, известных специалистам в данной области техники (см., например, Anthony J. Brookes. The essence of SNPs. Gene Volume 234, Issue 2, 8 July 1999, 177-186; Fan et al., Highly Parallel SNP Genotyping. Cold Spring Harb Symp

Quant Biol 2003. 68: 69-78; Matsuzaki et al., Parallel Genotyping of Over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. Genome Res. 2004. 14: 414-425).

Способы могут включать определение того, какой аллель ОНП присутствует в образце, полученном от субъекта. В некоторых вариантах реализации определение наличия минорного аллеля может быть связано с повышенной секрецией IL-11 или предрасположенностью к развитию гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

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

получение образца нуклеиновой кислоты от указанного субъекта;

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

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

Способ скрининга может представлять собой или являться частью способа определения предрасположенности субъекта к развитию гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, или способа диагностики или прогнозирования, как описано в настоящей заявке.

Способ может дополнительно включать стадию идентификации субъекта как имеющего предрасположенность или подверженного повышенному риску развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, например, если у субъекта определено наличие минорного аллеля в положении полиморфного нуклеотида. Способ может дополнительно включать стадию выбора субъекта для лечения агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, и/или введения субъекту агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, для обеспечения лечения гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, у субъекта, или для предупреждения развития или прогрессирования гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, у субъекта.

ОНП, которые могут быть определены, включают один или более ОНП, перечисленных на фиг. 33, 34 или фиг. 35 заявки WO 2017/103108 A1 (включенной в настоящую заявку посредством ссылки). ОНП могут быть выбраны для определения как имеющие низкое P-значение или FDR (уровень ложноположительных результатов).

В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящей заявке, могут включать определение наличия или отсутствия связанных с гепатотоксичностью генетических факторов у субъекта, таких как описанные, например, в Njoku DB Int J Mol Sci. 2014; 15 (4): 6990-7003; Khoury T et al., J Clin Transl Hepatol. 2015; 3 (2): 99-108; Ahmad J and Odin JA, Clin Liver Dis. 2017; 21 (1): 55-72; Clare et al., Curr Hepatol Rep. 2017; 16 (3): 258-264 и Urban TJ et al., Pharmacogenomics. 2012 May; 13 (7): 735-738, полностью включенных в настоящую заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящей заявке, могут включать определение того, является ли субъект, подлежащий лечению, гетерозиготным или гомозиготным по изоформе CYP2E1 цитохрома P450 (CYP450). Способы и применения согласно настоящему изобретению могут включать стадию определения генотипа CYP2E1 субъекта и/или выбора субъекта для лечения, который является гетерозиготным или гомозиготным по CYP2E1.

В некоторых вариантах реализации в способе диагностики гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, идентификации субъекта, подверженного риску развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, и способах прогнозирования или предсказания ответа субъекта на лечение агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, используется показатель, отличный от обнаружения повышения экспрессии IL-11 или рецептора IL-11, или генетических факторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ диагностики гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, идентификации субъекта, подверженного риску развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, и способы прогнозирования или предсказания ответа субъекта на лечение агентом, способным ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, основаны на обнаружении, измерении и/или идентификации одного или более из следующих показателей:

повышенная сывороточная концентрация печеночных ферментов, таких как аланинаминотрансфераза (АЛТ/SGPT), лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и/или аспартатаминотрансфераза (АСТ/SGOT);

отношение АСТ/АЛТ более 0,5, более 1 или более 2;

повышенные уровни щелочной фосфатазы (ЩФ) в крови;

повышенные уровни гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ);

повышенная сывороточная концентрация цитокинов, таких как TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  и IFN $\gamma$ ;  
 сниженные уровни сывороточного альбумина;  
 увеличение общего билирубина (неконъюгированного (непрямого) и конъюгированного (прямого)), например, в контексте референтных диапазонов, описанных в VanWagner LB, JAMA. 313 (5): 516-517, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки;  
 потеря массы печени;  
 повышенное образование актиновых стресс-волокон гепатоцитов;  
 повышенный центрлобулярный некроз (т.е. некроз центрлобулярной ткани печеночной дольки);  
 пожелтение кожи и белков глаз (желтуха);  
 зуд;  
 боль в животе в верхней правой части живота;  
 усталость;  
 потеря аппетита;  
 тошнота и рвота;  
 сыпь;  
 потеря массы тела;  
 моча темного или чайного цвета.

Референсные уровни для лабораторных анализов печени можно найти, например, в Gowda S et al., Pan Afr Med J. 2009; 3: 17, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки.

Способы диагностики или прогнозирования могут быть осуществлены *in vitro* на образце, полученном от субъекта, или после обработки образца, полученного от субъекта. После взятия образца присутствие пациента для проведения способа диагностики или прогнозирования *in vitro* не требуется, и, следовательно, способ может являться способом, который не осуществляется в отношении организма человека или животного. Образец, полученный от субъекта, может быть любого вида, как описано выше в настоящей заявке.

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

#### Субъекты.

Субъекты могут представлять собой животных или людей. Субъекты предпочтительно представляют собой млекопитающих, более предпочтительно людей. Субъект может представлять собой млекопитающее, отличное от человека, но более предпочтительно представляет собой человека. Субъект может быть мужского или женского пола. Субъект может представлять собой пациента. Пациент может иметь гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, как описано в настоящей заявке. У субъекта может быть диагностирована гепатотоксичность и/или расстройство, заболевание или состояние, связанное с гепатотоксичностью, требующее лечения, у него может быть подозрение на наличие такой гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью, или он может быть подвержен риску развития гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

В вариантах реализации согласно настоящему изобретению субъект предпочтительно представляет собой человека. В вариантах реализации согласно настоящему изобретению субъект может быть выбран для лечения в соответствии со способами, основанными на определении характеристики одного или более маркеров (коррелятов/симптомов) гепатотоксичности и/или расстройства, заболевания или состояния, связанного с гепатотоксичностью.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект может быть выбран для лечения согласно настоящему изобретению на основании определения, что субъект испытывал, будет испытывать или испытывает гепатотоксическое поражение. В некоторых вариантах реализации субъект может быть выбран для лечения согласно настоящему изобретению до предполагаемого вмешательства, которое вызовет или может вызвать гепатотоксичность (например, хирургическое вмешательство, например, лечение агентом, связанным с гепатотоксичностью). В некоторых вариантах реализации субъект может быть выбран для лечения согласно настоящему изобретению после определения, что он испытывал или испытывает гепатотоксичность или гепатотоксическое поражение.

#### Дополнительные предложенные способы и применения.

В настоящем изобретении также предложен агент, способный ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, для применения, или применение агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов, в способе:

снижения повреждения ткани печени;  
 снижения гибели гепатоцитов; повышения функции печени;  
 снижения сывороточного уровня АЛТ;  
 увеличения массы печени; регенерации ткани печени или снижения активации (т.е. фосфорилирования) ERK и/или JNK в печени.

Настоящее изобретение также относится к применению агента, способного ингибировать опосредо-

ванную IL-11 передачу сигналов, для применения при производстве композиции для применения в способе: снижения повреждения ткани печени; снижения гибели гепатоцитов; повышения функции печени; снижения сывороточного уровня АЛТ; увеличения массы печени; регенерации ткани печени или снижения активации (т.е. фосфорилирования) ERK и/или JNK в печени.

В настоящем изобретении также предложен способ: снижения повреждения ткани печени; снижения гибели гепатоцитов; повышения функции печени; снижения сывороточного уровня АЛТ; увеличения массы печени; регенерации ткани печени или снижения активации (т.е. фосфорилирования) ERK и/или JNK в печени, включающий введение субъекту эффективного количества агента, способного ингибировать опосредованную IL-11 передачу сигналов.

Идентичность последовательностей.

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

#### Последовательности

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	IL-11 человека (UniProt P20809)	MNCVCRLVLVLSLWPDТАVAPGPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLADTRQLA AQLRDKFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQLPGVLRRLRADLLSYLRHVQWLRR AGGSSLKLEPELGTQARLDRLRLQLLLMSRLALPQPPDPPAPPLAPSSAWG GIRAAHAILGGLHLTLDWAVRGLLLKTRL
2	gp130 человека (UniProt P40189-1)	MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPGGYISPEPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYF HVNANYVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVFTDIASLNIQLTCNLTFGQLEQNVYGIT IISGLPPEKPKNLSCIVNEGKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKR DTPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNSVINSE ELSSILKLTWTNPSIKSVILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSFTVQDLKPFTE YVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKIDPSHTQGYRTVQLV WKTLPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNLNDRYLATLTVRNLVG KSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWVEWTTPRESVKKYILEWCVLSDK APCITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPS KGPTVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAENVVDSHTEYT LSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLG VLFNCFNRDLIKKIWPVNPDPKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKQMYSDGNFTDVS VVEIEANDKKPFPELDKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSSISSENESS QNTSSTVQYSTVVHSGYRHRQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGG DGILPRQYFQKNCQSHESPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGS GQMKMFQEVSAADAFPGTEGQVERFETVGMEEATDEGMPPKSYLPQTVRQGGYMPQ

3	IL11RA человека (UniProt Q14626)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCQAWGPPGVQYQPGRSVKLCCPGVTAGD PVSWFRDGEPKLLQGPDSGLGHELVLQAQADSTDEGTICQTLDGALGGTVTLQLGY PPARPVVSCQAADYENFSCWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGP WPCPQDPLGAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSLRPPDPPQG LRVESVPGYPRRLRASWTPASWPCQPHFLLKFRLLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEE VITDAVAGLPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGTIPKEIPAWGQLHTQP EVEPQVDSAPPRLSLQPHRLLDHRDSVEQVAVLASLGILSFLGLVAGALALGLWL RLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL
4	мишень миРНК в IL-11	CCTTCCAAAGCCAGATCTT
5	мишень миРНК в IL-11	GCCTGGGCAGGAACATATA
6	мишень миРНК в IL-11	CCTGGGCAGGAACATATAT
7	мишень миРНК в IL-11	GGTTCATTATGGCTGTGTT
8	мишень миРНК в IL-11Ra	GGACCATACCAAAGGAGAT
9	мишень миРНК в IL-11Ra	GCGTCTTTGGGAATCCTTT
10	мишень миРНК в IL-11Ra	GCAGGACAGTAGATCCCT
11	мишень миРНК в IL-11Ra	GCTCAAGGAACGTGTGTAA
12	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	CCUUCCAAAGCCAGAUUUdTdT-AAGAUUCUGGCUUUGGAAGGdTdT
13	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	GCCUGGGCAGGAACAUUAUdTdT-UAUUAUGUCCUGCCAGGCdTdT
14	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	CCUGGGCAGGAACAUUAUdTdT-UAUUAUGUCCUGCCAGGCdTdT
15	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	GGUUCAUUAUGGUCUGUdTdT-AACACAGCCAUAAUGAACcdTdT
16	миРНК к IL-11Ra (U32324.1)	GGACCAUACCAAAGGAGAUdTdT-AUCUCCUUUGGUAUGGUCCdTdT
17	миРНК к IL-11Ra (U32324.1)	GCGUCUUUGGAAUCCUUdTdT-AAAGGAUCCCAAAGACGCdTdT
18	миРНК к IL-11Ra (U32324.1)	GCAGGACAGUAGAUCCUdTdT-UAGGGAUCUACUGUCCUGcdTdT
19	миРНК к IL-11Ra (U32324.1)	GCUCAAGGAACGUGUGUAAdTdT-UUACACACGUUCCUUGAGcdTdT
20	Линкер из 20 аминокислот	GPAGQSGGGGGSGGGSGGGSV
21	Hyper-IL-11 (слияние IL-11RA:IL-11)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCQAWGPPGVQYQPGRSVKLCCPGVTAGD PVSWFRDGEPKLLQGPDSGLGHELVLQAQADSTDEGTICQTLDGALGGTVTLQLGY PPARPVVSCQAADYENFSCWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGP WPCPQDPLGAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSLRPPDPPQG LRVESVPGYPRRLRASWTPASWPCQPHFLLKFRLLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEE VITDAVAGLPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGPAGQSGGGGGSGGG SGGGSVPGPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLADTRQLAAQLRDKFPADGDHN LDSLPTLAMSAGALQPLPGVLRRLRADLLSYLRHVQWLRRAGGSSLKTLEPELGT LQARLDRLRLRLQLLMSRLALPQPPDPPAPPLAPPSSAWGGIRAAHAILGGLHLTLD WAVRGLLLKTRL
22	Праймер F для генотипирования F //11	GGAGGGAGGGGACGCCAATGACC
23	Праймер R для генотипирования F //11	TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG
24	Праймер F для генотипирования //11-люциферазы	AATCCGTGGTGTGTCG
25	Праймер R для генотипирования //11-люциферазы	TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG
26	Праймер F для генотипирования F //11-EGFP	GAAATGAGAGCCTAGAGTCCAGAG
27	Праймер R для генотипирования F //11-EGFP	GAGGCTTGAAGAATGCACAATTA
	//11-EGFP	

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

Признаки, раскрытые в предшествующем описании или в нижеприведенной формуле изобретения, или на прилагаемых графических материалах, выраженные в их конкретных формах или с точки зрения средства для выполнения раскрытой функции, или способа или процесса получения раскрытых результатов, в зависимости от обстоятельств, могут быть использованы, отдельно или в любой комбинации таких признаков, для реализации изобретения в его различных формах.

Во избежание каких-либо сомнений, любые теоретические объяснения, представленные в настоящей заявке, представлены для целей улучшения понимания читателя. Авторы изобретения не желают ограничиваться какими-либо из этих теоретических объяснений.

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

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

Необходимо отметить, что в контексте описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Диапазоны могут быть выражены в настоящей заявке в виде от "приблизительно" одного конкретного значения и/или до "приблизительно" другого конкретного значения. При таком обозначении диапазона другой вариант реализации включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, если значения выражены в виде приближений при помощи предшествующего термина "приблизительно", то следует понимать, что конкретное значение составляет другой вариант реализации. Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению является необязательным и означает, например, +/-10%.

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

В местах настоящего изобретения, где раскрыта последовательность нуклеиновой кислоты, также прямо рассматривается ее обратный комплемент.

Стандартные методы молекулярной биологии см. в источнике Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Аспекты и варианты реализации настоящего изобретения далее обсуждаются со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Дополнительные аспекты и варианты реализации будут понятны специалистам в данной области техники. Все документы, упомянутые в данном тексте, включены в настоящую заявку посредством ссылки. Несмотря на то, что изобретение было описано в сочетании с иллюстративными вариантами реализации, описанными ниже, многие эквивалентные модификации и вариации будут понятны специалистам в данной области техники при рассмотрении данного раскрытия. Соответственно, приведенные выше иллюстративные варианты реализации изобретения считаются иллюстративными и не имеющими ограничительного характера. В описанные варианты реализации изобретения могут быть внесены различные изменения, не отклоняясь от сущности и объема изобретения.

#### **Краткое описание графических материалов**

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

Фиг. 1A-1C. Влияние IL-11 на гепатоциты. (1A) Первичные гепатоциты человека экспрессируют рецептор IL-11R $\alpha$ . (1B) Дозозависимое увеличение уровней АЛТ в супернатанте и увеличение количества актиновых стресс-волокон в гепатоцитах после обработки IL-11 (0,019-10 нг/мл). (1C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированная экспрессия IL-11.

Фиг. 2A-2E. Влияние анти-IL-11 терапии на гепатотоксичность в мышинной модели индуцированного АРАР поражения печени. Антитело IgG использовали в качестве контроля. (2A) Схема, демонстрирующая режим лечения. (2B) Сывороточные уровни IL-11 после индуцированной АРАР токсичности. (2C) Уровни АЛТ, демонстрирующие степень повреждения печени. (2D) Степень индуцированной АРАР потери массы печени. (2E) Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E), демонстрирующее степень центрилобулярного некроза в ткани печени у мышей, получавших антитело к IL11R $\alpha$  или контрольное IgG.

Фиг. 3. Диаграмма рассеяния, демонстрирующая, что антитело к IL11RA предотвращает опосредованную АРАР гибель гепатоцитов. Гепатоциты человека обрабатывали АРАР (20 мМ) в присутствии или в отсутствие (BL) антитела к IL11RA (X209, 2 мкг/мл) или контрольного антитела IgG. Затем клетки окрашивали аннексином V и PI, и гибель клеток анализировали с помощью проточной цитометрии. BL = исходный уровень.

Фиг. 4. Изображение вестерн-блота, демонстрирующее, что антитело к IL11RA предотвращает опосредованную АРАР активацию Erk и Jnk. Гепатоциты человека обрабатывали АРАР (10 мМ) в присутствии или в отсутствие (BL) антитела к IL11RA (X209, 2 мкг/мл) или контрольного антитела IgG. Получали клеточные экстракты и проводили вестерн-блоттинг для оценки статуса активации (фосфорилирования) киназ Erk и Jnk. BL = исходный уровень.

Фиг. 5А и 5В. Коробчатая диаграмма и изображения, демонстрирующие, что анти-IL11RA терапия, проводимая за 16 ч до передозировки АРАР, предотвращает острое поражение печени. У мышей вызывали тяжелую передозировку АРАР (400 мг/кг) через 16 ч после в/б введения 20 мг/кг антитела к IL11RA (ENx209) или контрольного антитела IgG. Через 24 ч мышей умерщвляли. (5А) Измеряли сывороточную аланинаминотрансферазу (АЛТ) как маркер острого поражения печени и гибели гепатоцитов. (5В) Печени собирали, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, обезвоживали, помещали в парафиновые блоки, нарезали на срезы и затем окрашивали гематоксилином и эозином для визуализации характерного центрилобулярного некроза гепатоцитов, наблюдаемого при передозировке АРАР.

Фиг. 6А и 6В. Изображение и коробчатая диаграмма, демонстрирующие, что анти-IL11RA терапия, проводимая через 10 ч после передозировки АРАР, лечит острое поражение печени. У мышей вызывали тяжелую передозировку АРАР (400 мг/кг), и через 10 ч мышам в/б вводили 20 мг/кг антитела к IL11RA (ENx209) или контрольного антитела IgG. (6А) Печени собирали в указанные моменты времени, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и документировали макроскопическую морфологию и внешний вид. (6В) Измеряли сывороточную аланинаминотрансферазу (АЛТ) как маркер острого повреждения печени и гибели гепатоцитов в указанные моменты времени.

Фиг. 7. Изображение вестерн-блота, демонстрирующее, что анти-ILHRA терапия, проводимая через 10 ч после передозировки АРАР, ингибирует активацию Jnk и ERK. У мышей вызывали тяжелую передозировку АРАР (400 мг/кг), и через 10 ч мышам в/б вводили 20 мг/кг антитела к IL11RA (ENx209) или контрольного антитела IgG. Печени собирали в указанные моменты времени и проводили вестерн-блоттинг для оценки статуса активации (фосфорилирования) киназ Erk и Jnk.

Фиг. 8А-8С. График, изображения и коробчатая диаграмма, демонстрирующие, что анти-ILHRA терапия, проводимая через 10 ч после передозировки АРАР, предотвращает смерть из-за острого поражения печени и восстанавливает функцию печени. У мышей вызывали летальную передозировку АРАР (550 мг/кг), и через 10 ч мышам в/б вводили 20 мг/кг антитела к IL11RA (ENx209) или контрольного антитела IgG. (8А) График, демонстрирующий смертность в течение 8 дней после передозировки в двух группах лечения. (8В) Печени собирали в указанные моменты времени, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и документировали макроскопическую морфологию и внешний вид. (8С) Измеряли сывороточную аланинаминотрансферазу (АЛТ) как маркер повреждения печени и гибели гепатоцитов через 8 дней после передозировки у мышей, получавших ENx209, и сравнивали с уровнями у нормальных контрольных мышей.

Фиг. 9А-9J. Графики и изображения, демонстрирующие, что секреция IL11, индуцированная ацетиминофеном, из поврежденных гепатоцитов вызывает гибель клеток. (А) Уровни IL11 в сыворотке мышей, получавших АРАР. (В) мРНК IL11 печени после поражения посредством АРАР. (С) Репрезентативные изображения активности люциферазы в печени у контрольных мышей и получавших АРАР мышей с IL11-люциферазой. (D) Вестерн-блоты, демонстрирующие экспрессию IL11 в печени у мышей, получавших АРАР. (Е) Репрезентативные изображения иммунофлуоресценции (масштабные линейки, 100 мкм) EGFP и расщепленной каспазы3 (Cl. CASP3) в печени мышей IL11-EGFP после АРАР. (А-Е) АРАР, 400 мг кг<sup>-1</sup>. (F) ELISA секрети IL11 из стимулированных АРАР гепатоцитов. (G) Вестерн-блоты фосфорилированной ERK, JNK и Cl. Белок CASP3 и их соответствующая общая экспрессия в гепатоцитах в ответ на стимуляцию rhIL11. (H) Количественное определение пролиферации йодид-положительных (PI<sup>+</sup>) клеток из rhIL11-стимулированных гепатоцитов. (I) Вестерн-блоттинг, демонстрирующий статус активации ERK, JNK и CASP3 и (J) количественное определение PI<sup>+</sup> клеток в гепатоцитах, обработанных АРАР (20 мМ), в присутствии IgG или антитела к IL11RA (X209; 2 мкг мл<sup>-1</sup>). (F-J) Первичные гепатоциты человека (F, H-J) 24 ч. (А, В, F, H-I) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы). (А, В) Двусторонний критерий Стьюдента; (F, H) двусторонний критерий Даннетта; (J) двусторонний, скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента.

Фиг. 10А-10L. Изображения, графики и схемы, демонстрирующие, что рекомбинантный IL11 человека ингибирует эффекты IL11 мыши в гепатоцитах мыши. (А) Влияние рекомбинантного IL11 человека (rhIL11, 10 нг·мл<sup>-1</sup>) или рекомбинантного IL11 мыши (gmIL11, 10 нг·мл<sup>-1</sup>) на статус активации ERK, JNK и CASP3 в гепатоцитах мыши. (В) Уровни АЛТ в супернатанте гепатоцитов мыши после стимуляции gmIL11 (10 нг·мл<sup>-1</sup>) или путем увеличения доз rhIL11 (1, 5, 10, 15 и 20 нг·мл<sup>-1</sup>). (С) Схематическое изображение мышей, получавших однократную подкожную инъекцию физиологического раствора, rhIL11 или gmIL11 (500 мкг кг<sup>-1</sup>). (D) Вестерн-блот анализ печеночных p-ERK, p-JNK и Cl. CASP3, и (Е) сывороточные уровни АЛТ в экспериментах, показанных на фиг. 10С; для каждого периода времени (6, 24 ч) ящики слева направо соответствуют введению физиологического раствора, gmIL11 и rhIL11 (F) Схематическое изображение мышей, получавших подкожную инъекцию физиологического раствора, rhIL11 или gmIL11 за 2 ч до передозировки АРАР. Влияние инъекции rhIL11 или gmIL11 до передозировки АРАР на (G) измеренную сывороточную АЛТ через 6 и 24 ч (для каждого периода времени (6, 24 ч) ящики слева направо соответствуют введению физиологического раствора, gmIL11 и rhIL11) и на (H) активацию ERK и JNK в печени через 24 ч после введения АРАР. (I) Сенсограммы, демонстрирующие связывание mIL11RA1 с иммобилизованным rhIL11 (слева) и gmIL11 (посередине) и связывание hIL11RA с rhIL11

(справа). Показаны экспериментальные данные и теоретически аппроксимированные кривые (1:1 Ленгмюр). (J) Связывание биотинилированного gmIL11 с mL11RA1 в присутствии двукратных разведений gmIL11 (темно-серые точки, верхняя линия) и rhIL11 (светло-серые точки, нижняя линия) с помощью конкурентного ELISA. Дозозависимое ингибирующее действие rhIL11 на индуцированную gmIL11 (K) секрецию АЛТ и (L) активацию CASP3 гепатоцитами мыши. (A, B, K, L) 24 ч. (B, K) Данные представлены как среднее  $\pm$ СКО; (E, G) данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 процентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы). (B, K) Двусторонний, скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента; (E) двусторонний критерий Стьюдента; (G) двусторонний критерий Даннетта. FC: кратность изменения.

Фиг. 11A-11Q. Схема, изображения и графики, демонстрирующие, что IL11 вызывает печеночную недостаточность посредством NOX4-зависимого истощения глутатиона. (A) Схематическое изображение мышей Rosa26<sup>IL11/+</sup>, получавших однократную внутривенную инъекцию AAV8-ALB-Null (контроль) или AAV8-ALB-Cre (IL11-Tg) для специфичной индукции сверхэкспрессии IL11 в альбумин-экспрессирующих клетках (гепатоцитах); ALB: АЛЬБУМИН. (B) Репрезентативное макроскопическое исследование образцов печени, (C) масса печени, (D) сывороточные уровни АЛТ, (E) репрезентативные окрашенные H&E изображения печени (масштабные линейки, 100 мкм), (F) вестерн-блоттинг p-ERK, p-JNK и Cl. CASP3, (G) уровни GSH в печени и (H) уровни экспрессии мРНК Nox4 у контрольных мышей и у мышей IL11-Tg через 3 недели после инъекции. (I) Динамика уровней GSH, (J) дозозависимое снижение уровней GSH и (K) вестерн-блоты, демонстрирующие повышенную экспрессию белка NOX4 в первичных гепатоцитах человека, обработанных rhIL11. (L) Вестерн-блоты NOX4 в rhIL11 или gmIL11-стимулированных гепатоцитах мыши. (M) Вестерн-блоты экспрессии NOX4 и (N) уровни GSH в обработанных IgG и X209 APAP-стимулированных гепатоцитах человека (20 мМ). (O) Дозозависимое ингибирующее действие GKT-13781 на уровни GSH и активацию CASP3 в rhIL11-стимулированных гепатоцитах человека. Влияние siNOX4 на индуцированные rhIL11 уровни активации (P) ERK, JNK и CASP3 и (Q) уровни деплеции GSH в гепатоцитах человека. (I-Q) rhIL11/gmIL11 (10 нг·мл<sup>-1</sup>, если не указано иное), APAP (20 мМ), IgG/X209 (2 мкг мл<sup>-1</sup>), siNT (контроль ненацеленной миРНК)/siNOX4 (50 нМ). (I-K, M-Q) первичные гепатоциты человека, (L) первичные гепатоциты мыши. (J, L-Q) 24 ч. (C-D, G-J, N, O, Q) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 процентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы). (C-D, G-H) Двусторонний критерий Стьюдента; (I-J) двусторонний критерий Даннетта; (N, O, Q) двусторонний, скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента.

Фиг. 12A-12H. Схема, изображения и графики, демонстрирующие, что гепатоцит-специфичная делеция IL11ra1 защищает мышей от индуцированного APAP повреждения печени. (A) Схема индукции поражения посредством APAP у мышей IL11ra1<sup>loxP/loxP</sup>. Мышам IL11ra1<sup>loxP/loxP</sup> внутривенно вводили либо AAV8-ALB-Null (контроль), либо AAV8-ALB-Cre (СКО) для специфичной делеции IL11ra1 в гепатоцитах. Контрольным мышам и мышам СКО после голодания в течение ночи вводили APAP (400 мг кг<sup>-1</sup>) или физиологический раствор через 3 недели после введения вируса. ALB: Альбумин. (B) Репрезентативное макроскопическое исследование печени и (C) изображения H&E (масштабные линейки, 500 мкм) от контрольных мышей и мышей СКО, получавших инъекцию физиологического раствора и APAP. (D) Сывороточные уровни АЛТ, (E) сывороточные уровни АСТ, (F) сывороточные уровни GSH, (G) вестерн-блоты IL11RA, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, Cl. CASP3, CASP3 и GAPDH, и (H) относительные уровни экспрессии мРНК провоспалительных генов в печени. (D-F, H) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 процентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); t-критерий Стьюдента, скорректированный по Сидуку.

Фиг. 13A-13L. Схемы, изображения и графики, демонстрирующие лечение индуцированного APAP повреждения печени с помощью антитела к IL11RA и/или NAC. (A) Схема профилактического введения антитела к IL11RA (X209) мышам с передозировкой APAP; X209 или IgG (10 мг кг<sup>-1</sup>) вводили в начале периода голодания, за 16 ч до инъекции APAP (400 мг кг<sup>-1</sup>); контрольные мыши получали инъекцию физиологического раствора. (B) Сывороточные уровни АЛТ, (C) репрезентативные изображения H&E (масштабные линейки, 500 мкм) и уровни GSH в печени для экспериментов, показанных на фиг. 13A. (E) Схема экспериментов по определению дозы антитела к IL11RA (X209); X209 (2,5-10 мг кг<sup>-1</sup>) или IgG (10 мг кг<sup>-1</sup>) вводили мышам через 3 ч после инъекции APAP. (F) Сывороточные уровни АЛТ (значения для физиологического раствора были такими же, как в 5B), (G) уровни GSH в печени и (H) вестерн-блоты активации ERK и JNK в печени из экспериментов, показанных на фиг. 13E. (I) Схема, демонстрирующая терапевтическое сравнение X209 и N-ацетил-цистеина (NAC, 500 мг кг<sup>-1</sup>) по отдельности или в сочетании с X209 (5 мг кг<sup>-1</sup>). Мышам после голодания в течение ночи вводили IgG, NAC или NAC+X209 через 3 ч после инъекции APAP для данных, показанных на (J-L). Влияние лечения NAC, NAC+X209 на (H) сывороточные уровни АЛТ, на (I) уровни GSH в печени и на (J) p-ERK, p-JNK и Cl. Уровни экспрессии CASP3 (B, C, F, G, J, K) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 процентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); двусторонний t-критерий Стьюдента, скорректированный по Тьюки.

Фиг. 14A-14K. Схемы, изображения и графики, демонстрирующие регенерацию печени и обрати-

мость печеночной недостаточности при поздней терапии анти-IL11RA. (A) Схема, демонстрирующая позднее терапевтическое дозирование у мышей с поражением посредством APAP. Мышам после голодания в течение ночи вводили IgG/X209 (20 мг кг<sup>-1</sup>) через 10 ч после APAP. (B) Репрезентативное макроскопическое исследование печени, (C) репрезентативные изображения окрашенной H&E печени (масштабные линейки, 500 мкм), (D) сывороточные уровни IL11, (E) сывороточные уровни АЛТ, (F) вестерн-блоты p-ERK, p-JNK, Cl. CASP3, PCNA, циклина D1/D3/E1 и p-RB, (G) репрезентативные EdU-окрашенные изображения печени (масштабные линейки, 100 мкм) от мышей APAP, получивших позднюю дозу X209 (через 10 ч после APAP), как показано на фиг. 14A. (H) Вестерн-блоты, демонстрирующие уровни экспрессии белков PCNA, циклина D1/D3/E1, p-RB в печени мышей APAP, получивших либо NAC, либо NAC+X209 (фиг. 13G). (I) Схематическое изображение мышей, получивших лечение X209 (20 мг кг<sup>-1</sup>) через 10 ч после летальной передозировки APAP (550 мг кг<sup>-1</sup>), для данных, показанных на (J-K). (J) Кривые выживаемости мышей, получивших либо IgG, либо X209 через 10 ч после летальной передозировки APAP. (K) Макроскопическое исследование печени мышей, получивших контроль (D8), IgG (24 часа) и X209 (D8). (D, E) Данные представляют собой среднее±СКО; 2-сторонний ANOVA; (J) критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона.

Фиг. 15. Схема, относящаяся к поколению мышей с нокином IL11-люциферазы. Стратегия нокина Kozak-люцифераза-WPRE-polyA в экзон 1 локуса IL11 с использованием CRISPR/Cas9. Посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурков (WHP).

Фиг. 16. Схема, относящаяся к поколению мышей с нокином IL11-EGFP. Стратегия нокина кассеты 2A-EGFP в экзон 5 гена IL11, заменяющей стоп-кодон TGA, что приводит к трансляции белка IL11-2A-EGFP. Линкер 2A расщепляется, что приводит к удержанию EGFP в клетках, которые экспрессируют и секретируют IL11.

Фиг. 17A и 17B. Диаграммы рассеяния, демонстрирующие гепатотоксические эффекты IL11. Репрезентативные графики прямого светорассеяния (FSC) проточной цитометрии окрашивания пропидия йодидом (PI) первичных гепатоцитов человека, стимулированных (A) возрастающей дозой rhIL11 и (B) APAP в присутствии IgG или X209 (2 мкг мл<sup>-1</sup>).

Фиг. 18A-18F. Графики изображений и таблица, демонстрирующие видоспецифичные эффекты или IL11 человека или мыши на гепатоциты человека или мыши. (A) Влияние рекомбинантного IL11 человека (rhIL11, 10 нг·мл<sup>-1</sup>) или рекомбинантного IL11 мыши (gmIL11, 10 нг·мл<sup>-1</sup>) на статус активации ERK, JNK и CASP3 в гепатоцитах человека. (B) Уровни АЛТ в супернатанте гепатоцитов человека, стимулированных либо rhIL11 (10 нг·мл<sup>-1</sup>), либо возрастающей дозой gmIL11 (1, 5, 10, 15 и 20 нг·мл<sup>-1</sup>). (C) Влияние лечения rhIL11 и gmIL11 в отдельности (фиг. 10C) или (D) с введением APAP (фиг. 10F) на сывороточные уровни АСТ у мышей; для каждого периода времени (6, 24 ч) ящики слева направо соответствуют введению физиологического раствора, gmIL11 и rhIL11. (E) Аффинность связывания и кинетические константы для взаимодействия IL11RA мыши с IL11 мыши или IL11 человека и для взаимодействия IL11RA человека с IL11 человека. (F) Вестерн-блоты, демонстрирующие дозозависимое ингибирующее действие rhIL11 на p-ERK, ERK, p-JNK, JNK в гепатоцитах мыши, стимулированных gmIL11 (10 нг·мл<sup>-1</sup>, 24 ч), (B) данные представлены как среднее±СКО; (C,D) данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 процентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы). (B) Двусторонний скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента; (C) двусторонний критерий Стьюдента; (D) двусторонний критерий Даннетта. FC: кратность изменения.

Фиг. 19A-19E. Графики и изображение, демонстрирующие, что сверхэкспрессия IL11, специфичная для гепатоцитов, вызывает некровоспаление печени. (A) Масса сердца, легких, почек, (B) уровни АСТ в сыворотке, (C) количественное определение диаметра портальной вены, (D) вестерн-блоты общей ERK, общей JNK и CASP3, и (E) относительные уровни экспрессии мРНК провоспалительных маркеров в печени контрольных мышей и мышей IL11-Tg (фиг. 11A). (A-C, E) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 процентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); двусторонний t-критерий Стьюдента.

Фиг. 20A-20D. Изображение и графики, демонстрирующие, что только видоспецифичный IL11 индуцирует истощение NOX4 и глутатиона в гепатоцитах. Влияние rhIL11 и gmIL11 (10 нг·мл<sup>-1</sup>) на (A) экспрессию белка NOX4, (B) уровни GSH в гепатоцитах человека, (C) уровни GSH в гепатоцитах мыши. (D) Уровни GSH в печени после введения rhIL11 или gmIL11 мышам (фиг. 10C); для каждого периода времени (6, 24 ч) ящики слева направо соответствуют введению физиологического раствора, gmIL11 и rhIL11. (B-D) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 процентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); двусторонний критерий Даннетта.

Фиг. 21A и 21B. Графики, демонстрирующие, что рекомбинантный IL11 человека (rhIL11) восстанавливает уровни GSH в пораженной печени мыши. (A) Дозозависимое ингибирующее действие rhIL11 на уровни GSH в первичных гепатоцитах мыши, стимулированных gmIL11; двусторонний скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента. (B) Влияние rhIL11 или gmIL11 на уровни GSH в печени мышей после поражения посредством APAP, как показано на фиг. 10F; двусторонний критерий Даннетта. Для каждого периода времени (6, 24 ч) ящики слева направо соответствуют введению физиологического рас-

твора, gmIL11 и gh IL11. (А, В) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы).

Фиг. 22А и 22В. Изображение и график, демонстрирующие, что ингибитор NOX4 GKT-137831 предотвращает гепатотоксические эффекты IL11. Дозозависимое ингибирующее действие ингибитора GKT-137831 NOX4 на (А) активацию ERK и JNK и на (В) секрецию АЛТ из гепатоцитов человека, стимулированных rhIL11 (10 нг·мл<sup>-1</sup>, 24 ч). (В) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); двусторонний скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента. FC: кратность изменения.

Фиг. 23А и 23В. Изображение и график, демонстрирующие, что NOX4 играет ключевую роль в гепатотоксическом эффекте IL11. (А) Вестерн-блоты, демонстрирующие эффективность выключения siNOX4. (В) Влияние siNOX4 на gh IL11 -индуцированную гибель первичных гепатоцитов человека и высвобождение АЛТ. (А-В) rhIL11 (10 нг·мл<sup>-1</sup>), siNT (контроль ненацеленной миРНК)/siNOX4 (50 нМ); 24 ч; данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); двусторонний скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента. FC: кратность изменения.

Фигуры 24А и 24В. Графики, демонстрирующие, что контрольные мыши и мыши СКО имеют аналогичные сывороточные уровни АРАР и АРАР-глутатиона через 24 ч после введения АРАР. Количественное определение методом ЖХ-МС/МС (А) АРАР и (В) АРАР-глутатиона в сыворотке контрольных мышей и мышей СКО. Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); двусторонний t-критерий Стьюдента.

Фиг. 25А-25С. Графики, демонстрирующие, что антитело к IL11RA (X209) снижает сывороточный уровень АСТ после поражения посредством АРАР. (А) Сывороточные уровни АСТ у мышей, получавших физиологический раствор и АРАР, получивших профилактическую дозу X209 (10 мг кг<sup>-1</sup>) за 16 ч до АРАР (фиг. 13А). (В) Дозозависимый эффект X209 на сывороточные уровни АСТ у мышей АРАР, получивших терапевтическую дозу X209 через 3 ч после введения АРАР (фиг. 13D, значения для физиологического раствора те же, как в S11А). (С) Сывороточные уровни АСТ у мышей, получавших НАС (500 мг кг<sup>-1</sup>), по отдельности или в сочетании с X209 (5 мг кг<sup>-1</sup>), через 3 ч после поражения посредством АРАР (фиг. 13G). (А-С) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); двусторонний скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента.

Фиг. 26А и 26В. Графики, демонстрирующие сывороточные уровни АРАР и АРАР-глутатиона у мышей через 24 часа после передозировки АРАР. Количественное определение методом ЖХ-МС/МС (А) АРАР и (В) АРАР-глутатиона у контрольных мышей, получивших физиологический раствор, и у мышей, получивших IgG и X209 через 24 часа после введения АРАР. Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы); Двусторонний скорректированный по Тьюки критерий Стьюдента.

Фиг. 27А и 27В. График и изображение, демонстрирующие, что X209 обращает вспять индуцированное АРАР повреждение печени. (А) Сывороточные уровни АСТ и (В) вестерн-блоты, демонстрирующие содержание в печени общей ERK, JNK, CASP3 и RB у мышей в экспериментальных группах по исследованию обратимости, как показано на фиг. 14А.

Фиг. 28А и 28В. Изображение и график, демонстрирующие восстановление мышей, получавших X209, после введения летальной дозы АРАР. (А) Иллюстративные изображения с Н&Е (масштабные линейки, 500 мкм) печеней от мышей, получавших лечение IgG (через 24 ч после АРАР) и X209 (D8 после АРАР). (В) Сывороточные уровни АЛТ у мышей, получивших физиологический раствор в качестве контроля, и мышей, получивших X209 (D8 после АРАР).

Фиг. 29. Схема предлагаемого механизма и роли IL11 в индуцированной АРАР гепатотоксичности. Метаболизация АРАР в печени приводит к выработке АФК посредством NAPQI и вызывает секрецию IL11. Аутокринная сигнализация IL11 замыкается на гепатоцитах и продолжает генерировать АФК посредством NOX4, который управляет устойчивой гибелью клеток и ограничивает регенерацию печени независимо от АРАР и его метаболитов. Если путь IL11 блокирован генетически или терапевтически, можно предотвратить гибель гепатоцитов и восстановить регенерацию печени.

Фиг. 30А и 30В. Коробчатые диаграммы, демонстрирующие, что анти-IL11 терапия, проводимая за 16 часов до передозировки АРАР, предотвращает острое поражение печени. У мышей вызывали тяжелую передозировку АРАР (400 мг/кг) через 16 ч после в/б введения 20 мг/кг антитела к IL11 (ENx203) или контрольного антитела IgG. Через 24 ч мышей умерщвляли. (30А) Измеряли сывороточную аланинаминотрансферазу (АЛТ) и (30В) аспаратаминотрансферазу (АСТ) как корреляты острого повреждения печени и гибели гепатоцитов.

Фиг. 31А-31К. Диаграммы рассеяния, коробчатые диаграммы, гистограммы и изображения, относящиеся к экспрессии рецепторов IL-11 и IL-6 и эффектам передачи сигналов IL-11 и IL-6 в первичных гепатоцитах человека. (31А) Репрезентативные графики прямого рассеяния (FSC) проточной цитометрии и интенсивности флуоресценции окрашивания IL11RA, IL6R и gp130 на гепатоцитах. (31В) Распростра-

ненность чтений IL11RA1 и IL6R в гепатоцитах на базальном уровне на основе RNA-seq (слева) и Ribo-seq (справа) (транскриптов на миллион, TPM). (31C и 31D) Охват чтений транскриптов (31C) IL11RA1 и (31D) IL6R на основе RNA-seq и Ribo-seq гепатоцитов человека (n=3). (31E и 31F) (31E) Вестерн-блоты, демонстрирующие статус активации ERK, JNK и STAT3 и (31F) секреция АЛТ гепатоцитами после стимуляции hyperIL11 или hyperIL6 в диапазоне доз. (31G) Уровни АЛТ в супернатантах гепатоцитов, стимулированных hyperIL11, по отдельности или в присутствии возрастающих количеств растворимого gp130 (sgp130). (31H и 31I) Вестерн-блоты лизатов гепатоцитов, демонстрирующие (31H) фосфорилированные ERK и JNK и их соответствующую общую экспрессию в ответ на стимуляцию hyperIL11, по отдельности или с sgp130, и (31I) фосфорилированный STAT3 и общий STAT3 в ответ на стимуляцию hyperIL6 с sgp130 и без него. (31J) Иллюстративные графики FSC окрашивания пропидия йодидом (PI) стимулированных IL11 гепатоцитов в присутствии sgp130 или растворимого IL11RA (sIL11RA). (31K) Вестерн-блоты, демонстрирующие p-ERK, p-JNK и их соответствующую общую экспрессию в гепатоцитах в ответ на стимуляцию IL11, по отдельности или в присутствии sgp130 или sIL11RA. (31A-31K) Первичные гепатоциты человека; (31E-31K) 24-часовая стимуляция; (31E-31K) hyperIL11, hyperIL6, IL11 (20 нг/мл), sgp130, sIL11RA (1 мкг/мл). (31B, 31F-31G) Данные представлены в виде "ящика с усами" (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы).

Фиг. 32A-32H. Диаграммы рассеяния, коробчатые диаграммы, изображения и графики, относящиеся к экспрессии рецепторов IL-11 и IL-6 и эффектам передачи сигналов IL-11 и IL-6 в первичных гепатоцитах человека. (32A) Репрезентативные графики FSC окрашивания IL11RA, IL6R и gp130 на активированных клетках THP-1. (32B) Транскрипты gp130 в первичных гепатоцитах человека на основе RNA-seq и Ribo-seq (транскриптов на миллион, TPM). (32C) Охват чтений транскриптов gp130 на основе RNA-seq и Ribo-seq первичных гепатоцитов человека (n=3). (32D) Иммунофлуоресцентные изображения (масштабные линейки, 100 мкм) экспрессии IL11RA, IL6R, gp130 и альбумина в первичных гепатоцитах человека и активированных клетках THP-1. (32E) Базальные уровни растворимого IL6R в среде для гепатоцитов. (32F) Количественное определение окрашивания PI на IL11-стимулированных первичных гепатоцитах человека (клетки PI+ve) в присутствии sgp130 или sIL11RA. (32G) Дозозависимый эффект увеличения концентрации IL11 в присутствии 1 мкг/мл sgp130 или sIL11RA на уровни АЛТ, секреторируемые первичными гепатоцитами человека. (32H) Дозозависимый эффект увеличения концентрации sgp130 или sIL11RA на индуцированную IL11 секрецию АЛТ. (32B, 32G-32H) Данные представлены в виде "ящика с усами" с медианой (средняя линия), 25-75 перцентилями (ящик) и минимальными-максимальными значениями (усы). (32E-32F) Данные показаны как среднее±СКО; (32F-32H) скорректированный по Тьюки t-критерий Стьюдента.

### Примеры

В следующих примерах авторы изобретения демонстрируют, что IL-11 непосредственно влияет на выживаемость гепатоцитов, и что анти-IL-11 терапия может снижать гепатотоксичность. Авторы изобретения демонстрируют способность антагониста IL-11, вводимого до DILI, защищать гепатоциты от гибели и сохранять функцию печени, а также демонстрируют, что антагонист IL-11, вводимый после DILI, может обращать вспять симптомы повреждения печени и восстанавливать функцию печени.

Пример 1. Влияние IL-11 на гепатоциты.

Для исследования влияния IL-11 на гепатоциты были проведены эксперименты с первичными гепатоцитами человека в культуре клеток.

Гепатоциты человека (5200, ScienCell) выращивали и поддерживали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Среду для гепатоцитов (5201, ScienCell) с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллин-стрептомицина обновляли каждые 2-3 дня, и клетки пассировали при 80% конфлюэнтности с использованием стандартных методов трипсинизации. Все эксперименты проводили при низком пассаже клеток (P2-P3), и клетки выдерживали в бессывороточных условиях в течение 16 ч до соответствующих стимуляций (24 ч), которые проводили в бессывороточной среде для гепатоцитов. Стимулированные клетки сравнивали с нестимулированными клетками, которые выращивали в течение одинакового времени в тех же условиях (бессывороточные среды для гепатоцитов), но без стимулирующих факторов.

Экспрессию IL-11R $\alpha$  из гепатоцитов человека определяли с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания. Гепатоциты человека высевали на 8-луночные предметные стекла (1,5×10<sup>4</sup> клеток на лунку) за 24 ч до окрашивания. Клетки фиксировали в 4% PFA в течение 20 мин, промывали PBS, а неспецифические сайты блокировали блокирующим буфером (5% BSA в PBS) в течение 2 ч. Клетки инкубировали с антителом к IL11R $\alpha$  [EPR5446] (ab125015, Abcam, 1:100) в течение ночи (4C) с последующей инкубацией с антителом козы против антитела кролика IgG H&L (Alexa Fluor 488) (ab150077, Abcam, 1:200) в течение 1 ч. Предметные стекла с лунками сушили в темноте и добавляли к предметным стеклам 5 капель заливочной среды с DAPI за 15 мин до визуализации с помощью флуоресцентного микроскопа (Leica). Отрицательный контрольный образец подвергали той же процедуре, за исключением этапа инкубации с антителом к IL11R $\alpha$ .

Опосредованную IL-11 гибель гепатоцитов измеряли путем определения уровней аланинами-

нотрансферазы (АЛТ) в супернатанте гепатоцитов после обработки диапазоном доз IL-11 (0,019-10 нг/мл). Уровни АЛТ измеряли с использованием набора для анализа активности АЛТ (ab105134, Abcam) в соответствии с протоколом производителя. Сопутствующее количество стресс-волокон через 24 ч после стимуляции IL-11 определяли с помощью окрашивания родамин-фаллоидином.

Исследовали влияние активных форм кислорода (АФК; стимулированных перекисью водорода (0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 ч, 31642, Sigma) на первичные гепатоциты человека.

Результаты показаны на фиг. 1А-1С. Было обнаружено, что IL-11 непосредственно нарушал выживаемость гепатоцитов.

Было обнаружено, что первичные гепатоциты человека высоко экспрессируют рецептор IL-11R $\alpha$  (1А). Было обнаружено, что стимуляция IL-11 вызывает дозозависимую гибель гепатоцитов, о чем свидетельствует прогрессирующее повышение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) в физиологически значимом диапазоне доз (1В). Кроме того, в диапазоне доз IL-11 постепенно стимулировал увеличение актиновых стресс-волокон в гепатоцитах (1В; микрофотографии во всем диапазоне доз), что отражает частичный эпителиально-мезенхимальный переход гепатоцитов, который, как известно, вызывает дисфункцию гепатоцитов (Grant Rowe et al. *Molecular and Cellular Biology* 2011; 31 (12): 2392-2403).

Поскольку АРАР, как известно, индуцирует поражение печени АФК-зависимым образом, авторы изобретения стимулировали гепатоциты человека посредством H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и обнаружили, что IL-11 был повышен в 10 раз в супернатанте (1С). Следовательно, IL-11 непосредственно вызывает гибель гепатоцитов и приводит гепатоциты к дисфункциональному частичному состоянию эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), который, как известно, ограничивает регенеративную способность печени (см. Grant Rowe et al., цитируемый выше).

Пример 2. Влияние анти-IL-11 терапии на гепатотоксичность.

Мышиную модель индуцированного ацетаминофеном (АРАР) поражения печени, использовали для исследования влияния анти-IL-11 терапии на гепатотоксичность.

Эти процедуры на животных были одобрены и проводились в соответствии с правилами Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC) SingHealth. Всем мышам давали пищу и воду без ограничений, за исключением периода голодания.

Вкратце, самцам мышей в возрасте 12-14 недель натошак внутривенно (в/б) инъецировали 10 мг/кг антитела к IL-11R $\alpha$  или контрольного изотипического IgG за 16 ч до инъекции АРАР (A3035, Sigma) (в/б, 400 мг/кг). Мышей умерщвляли через 24 ч после введения АРАР.

Уровни IL-11 в сыворотке крови мышей и супернатанте гепатоцитов количественно определяли с использованием набора Mouse IL-11 DuoSet (DY418 и DY008, R&D Systems) и набора Human IL-11 Quantikine ELISA kit D1100, R&D Systems), соответственно, в соответствии с протоколом производителя.

Образцы печени иссекали и фиксировали в течение 48 ч при комнатной температуре в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF), обезживали, помещали в парафиновые блоки и нарезали на срезы по 7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) в соответствии со стандартным протоколом и исследовали с помощью светового микроскопа.

Результаты показаны на фиг. 2А-2Е. Схема, демонстрирующая режим лечения, показана на фиг. 2А.

Как показано выше, выраженное повышение уровня IL-11 было обнаружено в сыворотке после токсичности АРАР (2В), среднее $\pm$ СКО, контроль, n=2; АРАР, n=3. Было обнаружено, что у мышей, получивших однократную дозу антитела к IL11R $\alpha$ , уровни АЛТ были значительно ниже (на 55% ниже по сравнению с контролем IgG; 2С), то есть, степень повреждения печени была заметно снижена. Было также обнаружено, что анти-IL-11 терапия предотвращает индуцированную АРАР потерю массы печени, которая отражает разрушение клеток печени, по сравнению с 24% потерей массы печени при использовании контрольного антитела IgG (индекс печени; 2D). (Е) Гистология печени с помощью окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) показала тяжелый центрилобулярный некроз у мышей, получивших IgG -типичный гистологический признак токсичности АРАР, который, как было обнаружено, был снижен с помощью анти-IL11R $\alpha$  терапии.

Мобильность и активность мышей, получивших контрольное IgG или антитело к IL-11R $\alpha$ , наблюдали через 24 ч после лечения АРАР. У мышей, получивших контрольное IgG, было обнаружено статическое/агонирующее состояние с видимыми признаками плохого здоровья (например, пилоэрекция, сгорбленная поза), тогда как у мышей, получивших антитело к IL-11R $\alpha$ , была нормальная подвижность и активность.

Следовательно, ингибирование передачи сигналов IL-11 путем блокирования IL-11R $\alpha$  предотвращает гепатотоксичность в принятой трансляционной модели индуцированного АРАР поражения печени (DILI).

Пример 3. Антагонизм опосредованной IL-11 передачи сигналов защищает гепатоциты от лекарственно-индуцированной гибели клеток.

Влияние антагонизма опосредованной IL-11 передачи сигналов на жизнеспособность гепатоцитов анализировали *in vitro*.

Гепатоциты человека (5200, ScienCell) культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде для гепатоцитов

(5201, ScienCell) с добавкой 2% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллин-стрептомицина. Среду заменяли каждые 2-3 дня, и клетки пассировали при 80% конfluence с использованием стандартных методов трипсинизации. Все эксперименты проводили при низком пассаже клеток (P2-P3). Клетки выдерживали в бессывороточных условиях в течение 16 ч до их использования в экспериментах путем культивирования в бессывороточной среде для гепатоцитов.

В первом эксперименте гепатоциты обрабатывали APAP (A3035, Sigma) в конечной концентрации 20 мМ в течение 24 ч в отсутствие (исходный уровень, BL) или в присутствии антагонистического антитела к IL11RA (X209, 2 мкг/мл) или изотипически сходного контрольного антитела IgG (IgG, 2 мкг/мл).

Затем гепатоциты окрашивали с использованием набора для определения апоптоза мертвых клеток FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (V13242, Thermo Fisher) в соответствии с инструкциями производителя, и окрашенные аннексином V-FITC/PI клетки анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием проточного цитометра BD LSRFortessa (BD Bioscience). Анализировали 10000 клеток на образец. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo версии 7.

Результаты показаны на фиг. 3. Было обнаружено, что обработка гепатоцитов ингибитором опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющим собой антагонистическое антитело, существенно снижает долю мертвых гепатоцитов.

В отдельном эксперименте гепатоциты обрабатывали APAP (A3035, Sigma) в конечной концентрации 10 мМ в течение 24 ч в отсутствие (исходный уровень, BL) или в присутствии антагонистического антитела к IL11RA (X209, 2 мкг/мл) или изотипически сходного контрольного антитела IgG (IgG, 2 мкг/мл).

Белковые экстракты получали из гепатоцитов с использованием буфера для радиоиммунопреципитационного анализа (RIPA), содержащего ингибиторы протеазы и фосфатазы (Thermo Scientific), с последующим центрифугированием для осветления лизата. Концентрации белка определяли с помощью метода Бредфорда (Bio-Rad). Равные количества белковых лизатов разделяли с помощью SDS-PAGE, переносили на мембрану из ПВДФ и подвергали иммуноблоттинговому анализу на указанные первичные антитела (ERK, pERK, pJNK). Белки визуализировали с использованием системы детектирования ECL (Pierce) с соответствующими вторичными антителами.

Результаты показаны на фиг. 4. Было обнаружено, что обработка гепатоцитов с помощью APAP значительно повышает уровни p-ERK и pJNK (см. BL по сравнению с IgG). Было обнаружено, что обработка гепатоцитов ингибитором опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющим собой антагонистическое антитело, существенно снижает уровни p-ERK и pJNK (см. IgG по сравнению с X209).

Пример 4. Антагонизм опосредованной IL-11 передачи сигналов защищает от лекарственного поражения печени.

У самцов мышей в возрасте 12-14 недель вызывали тяжелую передозировку APAP (400 мг/кг) или вводили эквивалентный объем физиологического раствора путем в/б инъекции, через 16 ч после в/б введения вводили 20 мг/кг антагонистического антитела к IL11RA (X209) или изотипически сходного контрольного антитела IgG.

Через 24 ч после введения APAP мышью умерщвляли. Измеряли сывороточные уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) с использованием набора для анализа активности АЛТ (ab105134, Abcam) в соответствии с инструкциями производителя, и собирали образцы печени, фиксировали в течение 48 ч при комнатной температуре в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF), обезвоживали, помещали в парафиновые блоки и нарезали на срезы по 7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) в соответствии со стандартным протоколом и исследовали с помощью светового микроскопа.

Результаты показаны на фиг. 5А и 5В. Было показано, что предварительное лечение ингибитором опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющим собой антагонистическое антитело к IL-11R $\alpha$ , значительно защищает мышью от DILI-ассоциированного ингибирования функции печени, о чем свидетельствует существенное снижение сывороточных уровней АЛТ (фиг. 5А). Печень мышью, получавших предварительное лечение ингибитором опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющим собой антагонистическое антитело, также демонстрировала значительно меньший некроз гепатоцитов по сравнению с печенью контролей, получавших IgG (фиг. 5В).

В дополнительном эксперименте у самцов мышью в возрасте 12-14 недель вызывали тяжелую передозировку APAP (400 мг/кг) путем в/б инъекции, через 16 ч после в/б введения вводили 20 мг/кг антагонистического антитела к IL11 (X203) или изотипически сходного контрольного антитела IgG.

Через 24 ч после введения APAP измеряли сывороточные уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) у мышью с использованием наборов для анализа активности АЛТ (ab105134, Abcam) и АСТ (ab105135, Abcam) в соответствии с протоколом производителя.

Результаты показаны на фиг. 30А и 30В. Было показано, что предварительное лечение ингибитором опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющим собой антагонистическое антитело к IL-11, значительно защищает мышью от DILI-ассоциированного ингибирования функции печени, о чем свидетельствует существенное снижение сывороточных уровней АЛТ и АСТ.

Пример 5. Антагонизм опосредованной IL-11 передачи сигналов после лекарственного поражения печени обращает вспять симптомы повреждения печени и восстанавливает функцию печени.

У самцов мышей в возрасте 12-14 недель вызывали тяжелую передозировку APAP (400 мг/кг) или вводили эквивалентный объем физиологического раствора путем в/б инъекции, и через 10 ч вводили мышам 20 мг/кг антагонистического антитела к IL11RA (X209) или изотипически сходного контрольного антитела IgG, или не осуществляли никакого введения.

Мышей умерщвляли через 24, 36 и 48 ч. Анализировали сывороточные уровни АЛТ, как описано в примере 4. Печень собирали и фиксировали, как описано в примере 4, и делали цифровые фотографии.

Результаты показаны на фиг. 6А и 6В. Было показано, что ингибитор опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющий собой антагонистическое антитело, вводимый через 10 ч после тяжелой передозировки APAP, восстанавливает макроскопическую морфологию печени до уровня мышей, не получавших APAP (фиг. 6А). Кроме того, было продемонстрировано, что ингибитор опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющий собой антагонистическое антитело, вводимый через 10 ч после тяжелой передозировки APAP, предотвращает DILI-ассоциированное ингибирование функции печени у мышей, о чем свидетельствует существенное снижение сывороточных уровней АЛТ (фиг. 6В).

На белковых экстрактах, полученных из печени мышей, также проводили вестерн-блоттинг. Ткань печени гомогенизировали в буфере для радиоиммунопреципитационного анализа (RIPA), содержащем ингибиторы протеазы и фосфатазы (Thermo Scientific), а затем лизаты разделяли с помощью SDS-PAGE и анализировали с помощью вестерн-блоттинга, как описано в примере 3.

Результаты показаны на фиг. 7. Передозировка APAP значительно повышала уровни p-ERK, pJNK1 и pJNK2 (см. контроль по сравнению с 10 ч). Последующее лечение ингибитором опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющим собой антагонистическое антитело, существенно снижало уровни p-ERK, pJNK1 и pJNK2 (см. IgG по сравнению с X209).

В дальнейших экспериментах у самцов мышей в возрасте 12-14 недель вызывали летальную передозировку APAP (550 мг/кг) или вводили эквивалентный объем физиологического раствора путем в/б инъекции, и через 10 ч вводили мышам 20 мг/кг антагонистического антитела к IL11RA (X209) или изотипически сходного контрольного антитела IgG, или не осуществляли никакого введения.

Выживаемость мышей контролировали в течение 8 дней после введения APAP/физиологического раствора, и результаты показаны на фиг. 8А. Лечение ингибитором опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющим собой антагонистическое антитело, значительно улучшало выживаемость мышей, которым вводили летальную дозу APAP, по сравнению с контрольными животными, получавшими IgG.

Мышей умерщвляли через 24 и 192 ч (8 дней). Анализировали сывороточные уровни АЛТ, как описано в примере 4. Печени собирали и фиксировали, как описано в примере 4, и делали цифровые фотографии.

Результаты показаны на фиг. 8В и 8С. Было показано, что ингибитор опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющий собой антагонистическое антитело, вводимый через 10 ч после летальной передозировки APAP, восстанавливает макроскопическую морфологию печени до уровня мышей, не получавших APAP, через 8 дней (фиг. 8В). Кроме того, было продемонстрировано, что ингибитор опосредованной IL-11 передачи сигналов, представляющий собой антагонистическое антитело, вводимый через 10 ч после летальной передозировки APAP, предотвращает DILI-ассоциированное ингибирование функции печени у мышей; сывороточные уровни АЛТ существенно не отличались от уровней у нормальных (получавших физиологический раствор) контрольных мышей через 8 дней (фиг. 8С).

Способность лечения антагонистом опосредованной IL-11 передачи сигналов, вводимым через 10 часов после гепатотоксического поражения, обращать вспять гепатотоксичность, связанную с DILI, и предотвращать смерть субъектов с тяжелой/летальной передозировкой APAP, была поистине впечатляющим результатом. Считается, что 10 ч после передозировки у мышей эквивалентны приблизительно 24 ч после передозировки у людей.

Результаты идентифицируют чрезвычайную перспективность антагонизма опосредованной IL-11 передачи сигналов в качестве терапевтической стратегии для снижения поражения печени и связанной с ним заболеваемости/смертности после гепатотоксического поражения.

Пример 6. Антагонизм опосредованной IL-11 передачи сигналов после лекарственного поражения печени обращает вспять симптомы повреждения печени и восстанавливает функцию печени.

#### 6.1. Обзор.

Передозировка ацетаминофена (APAP) является основной причиной печеночной недостаточности. В мышинной модели индуцированного APAP поражения печени (AILI) введение рекомбинантного интерлейкина-11 человека (rhIL11) оказывает защитное действие.

Настоящее изобретение демонстрирует, что благоприятный эффект rhIL11 в мышинной модели AILI обусловлен неожиданным ингибирующим действием чужеродного rhIL11 на активность эндогенного IL11 мыши. В отличие от принятой теории, IL11 секретируется поврежденными гепатоцитами для управления апоптозом и ингибирования регенерации печени.

У мышей со специфичной для гепатоцитов экспрессией IL11 спонтанно развивается повреждение печени, тогда как мыши с делецией IL11ra1 надежно защищены от AILI. Нейтрализующие антитела к IL11R, вводимые мышам в состоянии агонии через 10 часов после летальной передозировки APAP, обес-

печивают 90% выживаемость.

Данные в настоящей заявке опровергают ошибочное представление, указывают на механизм заболевания и идентифицируют терапевтическую мишень.

#### 6.2. Введение.

Ацетаминофен (N-ацетил-п-аминофенол, APAP) является безрецептурным анальгетиком, который часто принимают в количествах, вызывающих передозировку (OD), приводящую к индуцированному APAP поражению печени (AILI) - основной причине острой печеночной недостаточности (1). Антиоксидант N-ацетилцистеин (NAC) эффективен у пациентов, рано обращающихся в лечебное учреждение (2), но медикаментозного лечения, эффективного по прошествии восьми часов после передозировки, не существует, и в отсутствие возможности трансплантации печени может наступить смерть (3, 4).

В гепатоцитах APAP метаболизируется до N-ацетил-п-бензохинонимина (NAPQI), который истощает уровни клеточного глутатиона (GSH) и повреждает митохондриальные белки, что приводит к выработке активных форм кислорода (АФК) и активации JNK (5). Активация JNK, связанная с АФК, приводит к комбинации некротической, апоптотической и других форм гибели гепатоцитов, вызывающей печеночную недостаточность (1, 6, 7). Ингибиторы JNK и ASK1 обладают частичным защитным действием против AILI в мышинных моделях, но этот эффект не переносится на клинические условия (8, 9).

Регенерация печени увлекала людей со времен рассказов о Прометее и может быть поистине глубокой, как можно наблюдать после частичной резекции печени у грызунов и людей (10, 11). Однако в условиях AILI регенерация печени постоянно подавляется, что приводит к необратимому поражению и смерти пациента. Нацеливание на пути, препятствующие необычайной регенеративной способности печени, может запустить естественную регенерацию, которая может быть особенно полезна при AILI (12, 13).

Интерлейкин-11 (IL11) является малоизученным цитокином, который имеет решающее значение для активации миофибробластов и фиброза сердца, почек, легких и печени (14-16). Установлено, что IL11 секретируется из пораженных гепатоцитов, и IL11 может быть обнаружен на высоких уровнях в сыворотке в мышинной модели AILI, где его экспрессия считается компенсаторной и цитопротекторной (17). В соответствии с этой теорией введение рекомбинантного IL11 человека (rhIL11) эффективно при лечении на мышинной модели AILI, а также защищает от ишемии, эндотоксикоза или воспаления печени (17-22). Совсем недавно, в 2016 году, rhIL11 был предложен в качестве лечения для пациентов с AILI (23).

В исследованиях фиброза печени авторы изобретения сделали неожиданное наблюдение, что в контексте некоторых моделей фиброзно-воспалительного заболевания печени IL11 может отрицательно влиять на функцию гепатоцитов (14). Это очевидное расхождение с предыдущими литературными данными побудило авторов изобретения более подробно рассмотреть влияние IL11 на гепатоциты вне контекста фиброза, и они решили сделать это на мышинной модели AILI, где IL11 в значительной степени активирован (17).

#### 6.3. IL11 управляет APAP-индуцированной гибелью гепатоцитов.

Как сообщалось ранее (17), было подтверждено, что AILI характеризуется повышенными уровнями IL11 в сыворотке у мышей с поражением (фиг. 9A). Затем авторы изобретения рассмотрели, происходят ли повышенные сывороточные уровни IL11 в мышинной модели AILI из печени. APAP индуцировал сильную активацию транскриптов IL11 печени (35-кратный уровень,  $P < 0,0001$ ). Биоломинесцентная визуализация репортерной мыши с люциферазой, клонированной в стартовый кодон IL11, показала экспрессию IL11 во всей печени (фиг. 9B и 9C и фиг. 15). Вестерн-блоттинг подтвердил активацию IL11 на белковом уровне в ходе AILI (фиг. 9D). Эксперименты с использованием второй репортерной мыши с репортерной конструкцией EGFP, вставленной в 3'UTR IL11 (фиг. 16), показали, что после APAP белок IL11 на высоком уровне экспрессируется в некротических центрилобулярных гепатоцитах, что представляет собой патогномичную особенность AILI, которая имеет место одновременно с расщепленной каспазой 3 (Cl. CASP3) (фиг. 9E).

Определив источник активации IL11 в ходе AILI *in vivo*, авторы провели эксперименты *in vitro* для изучения лежащих в основе механизмов. Воздействие APAP на первичные гепатоциты человека приводило к дозозависимой секреции IL11 (фиг. 9F). Гепатоциты экспрессируют субъединицу альфа рецептора интерлейкина-11 (IL11RA), и известно, что IL11 активирует ERK в некоторых типах клеток (14), поэтому авторы изобретения исследовали влияние IL11 на активацию в гепатоцитах ERK и JNK, важных при AILI. IL11 индуцировал позднюю (>6 ч) и устойчивую активацию ERK и JNK, которая происходила одновременно с расщеплением CASP3 (фиг. 9G). Анализ на основе FACS показал дозозависимую гибель гепатоцитов, индуцированную IL11 (фиг. 9H и 17A). Чтобы исследовать роль передачи сигналов IL11 в гепатоцитах, подвергшихся воздействию APAP, авторы изобретения использовали нейтрализующее антитело к IL11RA (X209) (14), которое ингибировало расщепление CASP3 и гибель клеток, а также активацию ERK и JNK (фиг. 9I и 9J и фиг. 17B). Хотя эти данные подтверждают активацию IL11 при AILI, они опровергают распространенное мнение о том, что этот эффект является компенсаторным и защитным в пораженной печени.

#### 6.4. Видоспецифичные эффекты рекомбинантного IL11 человека.

Постоянно сообщается о защитной роли rhIL11 в моделях повреждения печени на грызунах (17-20, 23), однако результаты, описанные в примере 6.3, дают основания полагать, что rhIL11 оказывает прямо противоположный эффект на гепатоциты человека *in vitro* (фиг. 9). Это побудило авторов изобретения проверить потенциальные несоответствия при использовании белка rhIL11 у других видов, поскольку IL11 человека и мыши имеют только 82% гомологию белковой последовательности. Сначала они сравнивали эффекты rhIL11 по сравнению с рекомбинантным IL11 мыши (gmIL11) на гепатоциты мыши. Хотя gmIL11 от того же вида стимулировал фосфорилирование ERK и JNK и индуцировал расщепление CASP3 в гепатоцитах мыши, rhIL11 не оказывал никакого эффекта (фиг. 10A). Аналогичным образом, в то время как gmIL11 индуцировал гибель гепатоцитов мыши, для rhIL11 этого эффекта не наблюдалось. Безусловно, при более высоких дозах rhIL11 имел тенденцию к ингибированию гибели гепатоцитов мыши (фиг. 10A). В обратных экспериментах на гепатоцитах человека авторы изобретения обнаружили, что rhIL11 стимулирует передачу сигналов ERK и JNK и гибель гепатоцитов, тогда как для gmIL11 этого эффекта не наблюдалось (фиг. 18A и 18B).

Это показало, что роль передачи сигналов IL11 в гибели гепатоцитов сохраняется у различных видов, но рекомбинантный белок IL11 обладает видоспецифичными эффектами и не активирует путь у чужеродных видов. Эту гипотезу проверяли *in vivo* путем инъекции либо gmIL11, либо rhIL11 мышам (фиг. 10C). Инъекция gmIL11 приводила к постепенной активации ERK и немедленной активации JNK. Напротив, rhIL11 не оказывал влияния на фосфорилирование ERK или JNK (фиг. 10D). Инъекция gmIL11 также вызывала повреждение печени с повышенными уровнями АЛТ и АСТ (фиг. 10E и 18C). Напротив, инъекция rhIL11 у наивных мышей была связана с немного более низкими уровнями АЛТ и АСТ через 24 ч после инъекции (АЛТ,  $P=0,018$ ; АСТ,  $P=0,0017$ ). Для последующего наблюдения потенциального защитного эффекта rhIL11 у мышей был выполнен протокол, аналогичный исследованию AILI 2001 г. (20), в котором rhIL11 вводили мышам после передозировки APAP (фиг. 10F). Это подтвердило, что rhIL11 снижает тяжесть AILI у мышей (снижение: АЛТ, 52%,  $P=0,0001$ ; АСТ, 39%,  $P<0,0001$ ), тогда как gmIL11 от того же вида не оказывал защитного действия у мышей (фиг. 10G и 18D). Терапевтический эффект rhIL11 сопровождался снижением активации ERK и JNK в печени (фиг. 10H), что демонстрирует, что rhIL11 блокирует управляемые IL11 сигнальные пути в печени аналогично антителам к IL11RA (фиг. 9I).

С помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) было обнаружено, что rhIL11 связывается с альфа-цепью 1 рецептора интерлейкина-11 мыши (mIL11RA1) с  $K_D$  72 нМ, что немного сильнее, чем взаимодействие gmIL11: mIL11RA1 (94 нМ) и близко к тому, что сообщалось ранее для rhIL11:hIL11RA (50 нМ), что было подтверждено повторно (фиг. 10I и 18E) (24). Затем авторы изобретения провели конкурентный анализ ELISA и обнаружили, что rhIL11 конкурирует с gmIL11 за связывание с mIL11RA1 и является очень эффективным блокатором, о чем свидетельствует более высокая аффинность к mIL11RA1 (фиг. 10J). В гепатоцитах мыши rhIL11 был мощным, дозозависимым ингибитором gmIL11-индуцированных сигнальных путей и цитотоксической активности (фиг. 10K и 10L и фиг. 18F). Таким образом, как это ни парадоксально, чужеродный rhIL11 действует как нейтрализатор IL11 мыши как *in vitro*, так и *in vivo*, и эти наблюдения ставят под сомнение понимание роли IL11 в поражении печени и при заболеваниях в более широком смысле.

6.5. Специфичная для гепатоцитов экспрессия IL11 вызывает спонтанную печеночную недостаточность.

Для тестирования эффектов эндогенного IL11 мыши, секретируемого из гепатоцитов *in vivo*, трансген IL11 специфично экспрессировали в гепатоцитах путем инъекции мышам Rosa26<sup>IL11/+</sup> (15, 16) вируса AAV8, кодирующего конструкцию Cre, управляемую промотором альбумина (мыши IL11-Tg, фиг. 11A). Через три недели после индукции трансгена у мышей IL11-Tg наблюдались макроскопически аномальные и имеющие меньший размер (38%,  $P<0,0001$ ) печени с повышенными сывороточными уровнями АЛТ и АСТ, в то время как другие органы не были затронуты (фиг. 11A-11D и фиг. 19A и 19B). Гистологически была отмечена дилатация портальной вены и накопление крови в синусоидах - что свидетельствует о синдроме синусоидальной обструкции - а также инфильтраты вокруг портального тракта (фиг. 11E и фиг. 19C). Молекулярный анализ печени IL11-Tg выявил активацию ERK, JNK и расщепление CASP3 наряду с повышенной экспрессией провоспалительных генов (фиг. 11F, 19D и 19E). Таким образом, секреция IL11 из гепатоцитов, наблюдаемая при APAP-токсичности (фиг. 9), является гепатотоксичной.

6.6. IL11 стимулирует NOX4-опосредованную выработку активных форм кислорода Передача сигналов IL11 необходима для активации JNK, управляемой APAP, *in vitro* (фиг. 9I и 9J), которая, как известно, следует за выработкой АФК и истощением GSH. У мышей IL11-Tg исследовали уровни GSH в печени и обнаружили, что они были снижены (62%,  $P<0,0001$ ), что указывает на то, что передача сигналов IL11 - прямо или косвенно - индуцирует АФК (фиг. 11G).

В фибробластах экспрессия NOX4, НАДФН-оксидазы и источника АФК в значительной мере связана с экспрессией IL11 (15, 25), и специфичная для гепатоцитов делеция Nox4 предотвращает патологическую активацию JNK (26). Таким образом, авторы изобретения более подробно исследовали взаимосвязь между IL11, NOX4 и АФК. У мышей IL11-Tg уровень экспрессии Nox4 в печени был повышен (фиг. 11H). В первичных гепатоцитах человека IL11 стимулировал дозозависимое истощение GSH в те-

чение времени, которое отражало активацию ERK и JNK и сопровождалось повышением уровня NOX4 (фиг. 9G и 11I-11K). Как и ожидалось, только видоспецифичный IL11 индуцировал активацию NOX4 и снижал уровни GSH (фиг. 11L и фиг. 20A-20D).

Стимуляция APAP также приводила к активации NOX4 в гепатоцитах, что совпадало с истощением уровней GSH гепатоцитов, которое было блокировано антителом X209 к IL11RA (фиг. 11M и 11N). Авторы изобретения пересмотрели влияние rhIL11 на ингибирование индуцированной эндогенным IL11 гибели клеток в гепатоцитах мыши (фиг. 10J и 10K) и обнаружили четкие, дозозависимые эффекты rhIL11 в восстановлении уровней GSH в rhIL11-стимулированных клетках мыши (фиг. 21A). Аналогичным образом, rhIL11 восстанавливал индуцированное APAP истощение GSH у мышей, в то время как rmIL11 не оказывал этого действия (фиг. 21B). GKT-13781, специфичный ингибитор NOX4, предотвращал IL11-стимулированное истощение GSH, активацию CASP3 и гибель клеток дозозависимым образом (фиг. 11O, 22A и 22B). Специфичность фармакологического ингибирования NOX4 была подтверждена с использованием миРНК, которая предотвращала индуцированную IL11 гепатотоксичность (фиг. 11P и 11Q, 23A и 23B). Вместе эти данные показывают, что стимулируемая IL11 активность NOX4, которая также может влиять на митохондриальные АФК, важна для истощения GSH в контексте AILI.

6.7. Специфичная для гепатоцитов делеция IL11ra1 предотвращает индуцированную APAP печеночную недостаточность.

Для специфичной делеции IL11ra1 в гепатоцитах взрослых мышей создавали условные нокауты IL11ra1 (СКО) путем инъекции вируса AAV8-ALB-Cre мышам, гомозиготным по аллелям IL11ra1, фланкированным LoxP, наряду с контролями дикого типа. Через три недели после инфицирования вирусом контрольным мышам и СКО вводили APAP (400 мг кг<sup>-1</sup>) (фиг. 12A). На следующий день после введения APAP макроскопическое исследование выявило небольшие и обесцвеченные печени у контрольных мышей, тогда как печени у мышей СКО выглядели нормально (фиг. 12B). Гистология показала типичный и обширный центрилобулярный некроз у контрольных мышей, который не наблюдался у СКО (фиг. 12C).

Поразительно, что у мышей СКО уровни АЛТ и АСТ были на 99 и 95% ниже, соответственно, по сравнению с контрольными животными и уровнями GSH, которые были аналогичны исходному уровню. Обе группы имели одинаковые уровни APAP и APAP-глутатиона (метаболита APAP) в сыворотке, и, следовательно, делеция IL11ra1 не влияет на метаболизм APAP (фиг. 12D-12F, 24A и 24B). Активация ERK и JNK наблюдалась у контрольных мышей, но не у СКО (фиг. 12G). Делеция рецептора в гепатоцитах также значительно снижает воспалительные маркеры, что дает основания полагать, что воспаление в AILI является вторичным по отношению к паренхиматозному поражению. (фиг. 12H). В совокупности эти данные демонстрируют доминирующую роль специфичной для гепатоцитов передачи сигналов IL11 в патогенезе AILI. Тот факт, что делеция IL11ra1 в гепатоцитах является достаточной для защиты от передозировки APAP, указывает на то, что свободный растворимый IL11RA1 в сыворотке или рецептор, выделившийся из других клеточных источников, не способствует патогенезу заболевания посредством передачи транс-сигналов.

6.8. Влияние введения антитела к IL11RA на ранней стадии при индуцированном APAP поражении печени.

Затем авторы изобретения протестировали, является ли терапевтическое ингибирование передачи сигналов IL11 эффективным для смягчения AILI путем введения антитела к IL11RA (X209) (14). Первоначально профилактическое лечение проводили путем инъекции X209 или контрольного антитела (10 мг кг<sup>-1</sup>) за 16 ч до APAP. Этот подход снижал сывороточные маркеры повреждения печени более чем на 70%, в значительной степени восстанавливал уровни GSH в печени и ограничивал гистологические признаки центрилобулярного некроза (фиг. 13A-13D и 25A).

Далее вводили анти-IL11RA терапию в терапевтически релевантном режиме, давая антитело через 3 ч после APAP, то есть в момент времени, к которому осуществляется метаболизм и токсичность APAP и после которого большинство вмешательств не оказывают эффекта на мышиную модель AILI (фиг. 13E) (9). X209, в диапазоне доз (2,5-10 мг кг<sup>-1</sup>), ингибировал AILI с дозозависимыми улучшениями маркеров повреждения печени и уровней GSH в печени. Сниженная активация JNK и ERK подтвердила дозозависимый охват мишени (фиг. 13F-13H и 25B).

Наконец, было определено, повышало ли ингибирование передачи сигналов IL11 эффективность при введении в сочетании с текущим стандартом лечения, NAC, через 3 часа после введения APAP (фиг. 13I). Применение NAC в отдельности снижало сывороточные уровни АЛТ и АСТ. Однако NAC в сочетании с X209 был еще более эффективным, чем NAC или X209 в отдельности (снижение АЛТ: NAC, 38%, P=0,0007; X209, 47%, P<0,0001; NAC+X209, 75%; P<0,0001) (фиг. 13F, 13J и 25C). На молекулярном уровне степень ингибирования ERK и JNK с помощью NAC или NAC вместе с X209 отражала величину снижения АЛТ в сыворотке и восстановления уровней GSH в печени (фиг. 13K и 13L). Таким образом, анти-IL11RA терапия имеет дополнительные преимущества при назначении в сочетании с текущим стандартом лечения.

6.9. Регенерация печени при анти-IL11RA терапии.

Для пациентов, обратившихся в отделение неотложной помощи через 8 ч или позже после передозировки APAP, эффективное лечение отсутствует. Это побудило авторов изобретения протестировать

антитело к IL11RA через 10 ч после введения APAP (400 мг кг<sup>-1</sup>) мышам (фиг. 14А). Учитывая ускоренный метаболизм APAP у мышей, терапия через 10 ч в этой модели эквивалентна лечению у человека в течение до 24 ч после передозировки APAP. APAP и APAP-глутатион количественно определяли в сыворотке с помощью масс-спектрометрии, и было обнаружено, что уровни были повышены по сравнению с контролями, получавшими физиологический раствор, и эквивалентны между экспериментальными группами, как и ожидалось (фиг. 26А и 26В). Анализ макроскопического исследования, гистологии и сывороточных уровней IL11, АЛТ и АСТ показал, что X209 в значительной степени обращало вспять повреждение печени на второй день после APAP, тогда как мыши, получавшие IgG, имели глубокое и устойчивое повреждение печени (фиг. 14В-14Е и 27А). Терапевтическое антитело эффективно блокировало активацию ERK и JNK на протяжении всего эксперимента, после чего следовало снижение расщепленной CASP3 через 24 ч (фиг. 14F и 27В).

Вмешательства, способствующие регенерации печени, которые имеют очень большой потенциал, могут обеспечить новое средство для лечения AILI (12). Таким образом, оценивали статус генов, важных для регенерации печени (10). Ингибирование передачи сигналов IL11 было связано с надежными признаками регенерации с сильной активацией PCNA, циклина D1/D3/E1 и фосфорилированием RB, что наблюдалось во время регенерации после частичной гепатэктомии (10). Инъекция EdU (этинилдезоксидридина) и гистологические анализы показали очень большое количество ядер с признаками недавнего синтеза ДНК у мышей, получавших X209, по сравнению с контрольными животными (фиг. 14G). Эффекты X209, полученные через 3 ч после APAP (фиг. 13I-13L), были повторно оценены, чтобы понять, была ли регенерация также связана с ингибированием передачи сигналов IL11 в более ранние моменты времени. Это оказалось так, и комбинация X209 и NAC была более эффективной, чем NAC в отдельности, в увеличении уровней молекулярных маркеров регенерации, особенно для циклина D1 и D3 (фиг. 14H).

Наконец, X209 (20 мг кг<sup>-1</sup>) вводили через 10 часов после более высокой и летальной дозы ацетаминофена (550 мг кг<sup>-1</sup>) в момент времени, когда мыши были в состоянии агонии, а печень подвергалась фульминантному некровоспалению (фиг. 14I). Мыши, получавшие X209, выздоровели, и к концу исследования выживаемость составила 90%. Напротив, мыши, получавшие IgG, не выздоровели и погибли со 100% смертностью в течение 48 ч (фиг. 14J). На 8 день после летальной дозы APAP мыши, получавшие X209, казались здоровыми с нормальной морфологией печени, и уровни АЛТ были сопоставимы с контрольными животными, не получавшими APAP (фиг. 14K, 28А и 28В).

#### 6.10. Обсуждение.

Передозировка APAP является частым явлением, в Великобритании до 50000 человек обращаются в отделения неотложной помощи каждый год, у некоторых из них развивается печеночная недостаточность, требующая трансплантации (1). В настоящем исследовании показано, что IL11, который ранее был описан как защищающий от индуцированной APAP печеночной недостаточности (17, 20), ишемии (18, 21), эндотоксикоза (22) и воспаления (19) печени, на самом деле является гепатотоксичным и имеет первоочередное значение для печеночной недостаточности после передозировки APAP.

Наблюдение, что эндогенный IL11 является гепатотоксичным, является крайне удивительным, поскольку в более чем 30 публикациях сообщалось о цитопротекторных и/или противовоспалительных эффектах rhIL11 в моделях заболеваний человека на грызунах (табл. 1 и 2). Показано, что rhIL11 является конкурентным ингибитором связывания IL11 мыши с IL11RA1, что опровергает предыдущее понимание роли IL11 в AILI и заболевании печени в целом. Это также дает основания полагать, что анти-IL11 терапия может быть эффективной при других заболеваниях, при которых rhIL11 оказывал защитные эффекты в мышиных моделях, таких как, среди прочих, ревматоидный артрит (27) и колит (28) (табл. 2). На основании ошибочного предположения о том, что эффекты rhIL11 у мышей олицетворяли полезную мутацию с приобретением функции IL11, у пациентов был проведен ряд клинических исследований с использованием rhIL11 (табл. 3).

Таблица 1

Список публикаций, демонстрирующих защитные эффекты рекомбинантного IL11 человека (rhIL11) в моделях поражения печени на грызунах

<p>Yu et al. 2016. "Interleukin-11 Protects Mouse Liver from Warm Ischemia/reperfusion (WI/Rp) Injury." <i>Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology</i> 40 (5): 562–70</p>	<p>Введение <i>in vivo</i> rhIL11 (500 мкг/кг, в/в) до поражения WI/Rp защищает <u>печень мышей</u>. Предварительно лечение <i>in vitro</i> с помощью rhIL11 (2 мкг/мл, 12 часов) уменьшает апоптоз <u>гепатоцитов мыши</u> из-за гипоксии/реперфузии.</p>
<p>Zhu et al. 2015. "IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice." <i>PLoS One</i> 10 (5): e012629.</p>	<p>Гепатопротекторные эффекты rhIL11 у <u>мышей</u>, подвергнутых однократной инъекции rhIL11 (500 мкг/кг, в/б) за час до IRI. <i>In vitro</i> <u>гепатоциты мыши</u> обрабатывали 1 мкг/мл rhIL11.</p>
<p>Nishina et al. 2012. "Interleukin-11 Links Oxidative Stress and Compensatory Proliferation." <i>Science Signaling</i> 5 (207):ra5.</p>	<p>Введение суперагониста рецептора rhIL11 (Nт-3N, 500 мкг/кг) за 2 часа до инъекции ацетаминофена (APAP) снижает острое поражение печени у <u>мышей</u>.</p>
<p>Maeshima et al. 2004. "A Protective Role of Interleukin 11 on Hepatic Injury in Acute Endotoxemia." <i>Shock</i> 21 (2): 134–38.</p>	<p>Авторы приходят к выводу, что rhIL11 (150 мкг/кг, в/б) играет значительную защитную роль при LPS-индуцированном поражении печени (острый эндотоксикоз) у <u>крыс</u>.</p>
<p>Trepicchio et al. 2001. "Protective Effect of rhIL-11 in a Murine Model of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity." <i>Toxicologic Pathology</i> 29 (2): 242-249.</p>	<p>Авторы указывают на защитную роль rhIL11 (250 или 500 мкг/кг, п/к) против индуцированного ацетаминофеном повреждения печени, при котором rhIL11 вводили <u>мышам</u> за 2 часа до введения ацетаминофена.</p>
<p>Bozza et al. 1999. "Interleukin-11 Reduces T-Cell-Dependent Experimental Liver Injury in Mice." <i>Hepatology</i> 30 (6): 1441–47.</p>	<p>Введение rhIL11 (50-500 мкг/кг, в/б) за 2 часа до индуцированной конканавалином А опосредованной Т-клетками гепатотоксичности снижает некроз печени и повышает выживаемость у <u>мышей</u>.</p>

Таблица 2

Список публикаций, демонстрирующих защитное и/или противовоспалительное действие rhIL11 в других моделях заболеваний на грызунах

Кишечник	<i>Gibson et al. 2010. "Interleukin-11 Reduces TLR4-Induced Colitis in TLR2-Deficient Mice and Restores Intestinal STAT3 Signaling." Gastroenterology 139 (4): 1277–88.</i>	Авторы сообщают, что введение rhIL11 (5 мкг/кг, в/б) облегчает инфекционный колит и является цитопротекторным у мышей, лишённых TLR2.
	<i>Boerma et al. 2007. "Local Administration of Interleukin-11 Ameliorates Intestinal Radiation Injury in Rats." Cancer Research 67 (19): 9501–6.</i>	Авторы приходят к выводу, что IL11 облегчает раннее радиационное поражение кишечника, при котором крысам ежедневно инъецировали rhIL11 (2 мг/кг/сут) с 2 дней до облучения до 2 недель после облучения.
	<i>Opal et al. 2003. "Orally Administered Recombinant Human Interleukin-11 Is Protective in Experimental Neutropenic Sepsis." The Journal of Infectious Diseases 187 (1): 70–76.</i>	Авторы предполагают, что IL11 сохраняет целостность эпителиальных клеток во время циторедуктивной химиотерапии циклофосфамидом на основании эффектов, наблюдаемых у крыс, ежедневно перорально получающих rhIL11 (0,5 мг/кг/сут), начиная с 1 дня до первой дозы циклофосфамида в течение в общей сложности в течение 12 дней.
	<i>Ropesleski et al. 2003. "Interleukin-11-Induced Heat Shock Protein 25 Confers Intestinal Epithelial-Specific Cytoprotection from Oxidant Stress." Gastroenterology 124 (5): 1358–68.</i>	Авторы приходят к выводу, что IL11 обеспечивает эпителиально-специфичную цитопротекцию при поражении эпителия кишечника. Клеточные линии крыс, мышей и собак (IEC-18, YAMC, NIH3T3, MDCK-HR) стимулировали высокими (50-100 нг/мл) уровнями rhIL11.
	<i>Greenwood-Van Meerveld et al 2000. "Recombinant Human Interleukin-11 Modulates Ion Transport and Mucosal Inflammation in the Small Intestine and Colon." Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology 80 (8): 1269–80.</i>	Авторы приходят к выводу, что при воспалении кишечника IL11 действует как модулятор эпителиального транспорта или как противовоспалительный цитокин, основываясь на действиях rhIL11 на слизистые листы крыс (10-10000 нг/мл) и на крыс (33 мкг/кг, чередующиеся дни в течение 1 или 2 недель).
	<i>Du et al 1997. "Protective Effects of Interleukin-11 in a Murine Model of Ischemic Bowel Necrosis." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.</i>	Применение rhIL11 (250 мкг/кг/сут) в течение 3 дней до и в течение 7 дней после индукции ишемии кишечника обеспечивает защитный эффект от ишемического некроза кишечника, и авторы предлагают его применение в качестве лечения заболеваний слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта.
	<i>Orazi et al. 1996. "Interleukin-11 Prevents Apoptosis and Accelerates Recovery of Small Intestinal Mucosa in Mice Treated with Combined Chemotherapy and Radiation." Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology 75 (1): 33–42.</i>	Введение rhIL11 (250 мкг/кг) способствует восстановлению после химиотерапии и радиационно-индуцированного повреждения слизистой оболочки тонкой кишки мышей.
	<i>Potten et al 1996. "Protection of the Small Intestinal Clonogenic Stem Cells from Radiation-Induced Damage by Pretreatment with Interleukin 11 Also Increases Murine Survival Time." Stem Cells.1996 14(4):452-9.</i>	RhIL11 (100 мкг/кг, п/к), вводимый мышам до и после цитотоксического воздействия, защищает клоногенные клетки в кишечных криптах и увеличивает время выживания мышей после радиационного воздействия.
	<i>Qiu et al. 1996. "Protection by Recombinant Human Interleukin-11 against Experimental TNB-Induced Colitis in Rats." Digestive Diseases and Sciences 41 (8): 1625–30.</i>	Авторы описывают защитные эффекты rhIL11 при колите, вызванном тринитробензолсульфоновой кислотой, у крыс. Крысам ежедневно инъецировали rhIL11 (100, 300 или 1000 мкг/кг, п/к) за 3 дня до или ежедневно в течение 3-7-14 дней после введения TNB.
	<i>Du et al. 1994. "A Bone Marrow Stromal-Derived Growth Factor, Interleukin-11, Stimulates Recovery of Small Intestinal Mucosal Cells after Cytoablative Therapy." Blood 83 (1): 33–37.</i>	Введение rhIL11 (250 мкг/кг/сут, п/к) способствует восстановлению слизистой оболочки тонкой кишки после комбинированного облучения и химиотерапии у мышей.
Сердце	<i>Tamura et al. 2018. "The Cardioprotective Effect of Interleukin-11 against Ischemia-Reperfusion Injury in a Heart Donor Model." Annals of Cardiothoracic Surgery 7 (1):99-105.</i>	Введение rhIL11 (18 мкг/мл, в/в, за 10 минут до сбора сердца) сохраняет функцию сердца и снижает индекс апоптоза у крыс по модели ex vivo холодной ишемии.
	<i>Obana et al. 2012. "Therapeutic Administration of IL-11 Exhibits the Postconditioning Effects against Ischemia-Reperfusion Injury via STAT3 in the Heart." American Journal of Physiology.</i>	Введение rhIL11 (20 мкг/кг, в/в в начале реперфузии) предотвращает неблагоприятное ремоделирование сердца и апоптоз после ишемии-реперфузии, вызванным острым инфарктом миокарда, у мышей

	<i>Heart and Circulatory Physiology</i> 303 (5): H569–77.	
	<i>Obana et al. 2010. "Therapeutic Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Interleukin-11 Ameliorates Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction." Circulation</i> 121 (5): 684–91.	Введение rhIL11 (8 мкг/кг, в/в) через 24 часа после индуцированного лигированием левой коронарной артерии инфаркта миокарда (ИМ), а затем последовательно каждые 24 часа в течение 4 дней, уменьшает объем рубца после ИМ у мышей.
	<i>Kimura et al. 2007. "Identification of Cardiac Myocytes as the Target of Interleukin 11, a Cardioprotective Cytokine." Cytokine</i> 38 (2):107-115	Авторы приходят к выводу, что IL11 является кардиопротектором, основываясь на воздействии rhIL11 (8 мкг/кг), вводимого мышам за 15 часов до сердечной ишемии-реперфузии
Иммунная система	<i>Bozza et al. 2001. "Interleukin-11 Modulates Th1/Th2 Cytokine Production from Activated CD4 T Cells." Journal of Interferon &amp; Cytokine Research</i> 21(1):21-30.	Авторы заявляют, что IL11 действует непосредственно на активированные CD4+ve Т-клетки мыши и модулирует, а не подавляет иммунный ответ после стимуляции rhIL11 (1-500 нг/мл).
	<i>Opal et al. 2000. "Recombinant Human Interleukin-11 Has Anti-inflammatory Actions Yet Does Not Exacerbate Systemic Listeria Infection." The Journal of Infectious Diseases</i> 181(2): 754-756	Ежедневное введение rhIL11 (150 мг/кг, в/в) в течение 7 дней до листериоза снижает уровни интерферона-γ. Интерес представляет тот факт, что по заявлению авторов воспалительные маркеры IL-6/IFN-γ имеют тенденцию к снижению после лечения mAb к IL11 (10 мг/кг).
	<i>Hill et al. 1998. "Interleukin-11 Promotes T Cell Polarization and Prevents Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation." The Journal of Clinical Investigation</i> 102 (1): 115–23.	Авторы приходят к выводу, что IL11 предотвращает реакцию «трансплантат против хозяина» (GVHD) посредством поляризации Т-клеток, основываясь на экспериментах, в которых инъецировали высокую дозу rhIL11 (250 мкг/кг, п/к, два раза в сутки), на мышинной модели GVHD.
	<i>Sonis et al. 1997. "Mitigating Effects of Interleukin 11 on Consecutive Courses of 5-Fluorouracil-Induced Ulcerative Mucositis in Hamsters." Cytokine</i> 9 (8): 605–12.	Введение rhIL11 (50-100 мкг/животное/сут, п/к) защищает от индуцированного 5-фторурацилом язвенного мукозита у хомяков.
	<i>Trepicchio et al. 1997. "IL-11 Regulates Macrophage Effector Function through the Inhibition of Nuclear Factor-kappaB." Journal of Immunology</i> 159 (11): 5661–70.	Авторы приходят к выводу, что IL11 ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов макрофагами; первичные макрофаги мыши лечили rhIL11 (10-100 нг/мл).
	<i>Trepicchio et al. 1996. "Recombinant Human IL-11 Attenuates the Inflammatory Response through down-Regulation of Proinflammatory Cytokine Release and Nitric Oxide Production." Journal of Immunology</i> 157 (8): 3627–34.	Авторы сообщают, что IL11 снижает уровни TNF-α, IL-1β и IFN-γ в сыворотке мышей, получавших LPS, и в среде макрофагов, стимулированной LPS. Мышей и макрофаги мыши обрабатывали rhIL11 (500 мкг/кг или 10-100 нг/мл, соответственно).
	<i>Anguila et al. 1999. "Selective Anti-Inflammatory Action of Interleukin-11 in Murine Lyme Disease: Arthritis Decreases While Carditis Persists." The Journal of Infectious Diseases</i> 179 (3): 734–37.	Введение rhIL11 (0,1-2 мкг/мышь/сут, 5 дней/неделя в течение 3 недель) снижает артрит, но не кардит, у мышей, инфицированных <i>Borrelia burgdorferi</i> (мышинная модель болезни Лайма).
Суставы	<i>Walmesley et al. 1998. "An Anti-Inflammatory Role for Interleukin-11 in Established Murine Collagen-Induced Arthritis." Immunology</i> 95 (1): 31–37.	Ежедневное введение rhIL11 (0,3-100 мкг/мышь/сут, в/б, 10 дней) уменьшает воспаление в мышинной модели коллаген-индуцированного артрита.
	<i>Lee et al. 2012. "Interleukin-11 Protects against Renal Ischemia and Reperfusion Injury." American Journal of Physiology. Renal Physiology</i> 303 (8): F1216–24.	Авторы приходят к выводу, что IL11 является ренопротекторным, на основании эффектов предварительного лечения (10 минут до ишемии-реперфузии) и последующего лечения (30-60 минут после ишемии-реперфузии) rhIL11 и пегилированного rhIL11 (100-1000 мкг/кг, в/б) у мышей.
Почки	<i>Stangou et al. 2011. "Effect of IL-11 on Glomerular Expression of TGF-Beta and Extracellular Matrix in Nephrotoxic Nephritis in Wistar Kyoto Rats." Journal of Nephrology</i> 24 (1): 106–111.	Введение rhIL11 (800-1360 мкг/кг, в/б) за 2 часа до нефротоксического нефрита, а затем один раз в сутки в течение 6 дней подавляет отложение ВКМ у крыс.
	<i>Sheridan et al 1999. "Interleukin-11 Attenuates Pulmonary Inflammation and Vasomotor Dysfunction in Endotoxin-Induced Lung Injury." The American Journal of Physiology</i> 277 (5): L861–67.	Авторы приходят к выводу, что rhIL11 (200 мг/кг, в/б) оказывает противовоспалительное действие, которое защищает от индуцированного LPS поражения легких и летальности у крыс
Легкие	<i>Waxman et al. 1998. "Targeted Lung Expression of Interleukin-11 Enhances Murine Tolerance of 100% Oxygen and Diminishes Hyperoxia-Induced DNA Fragmentation." J. Clin. Invest.</i> 101(9):1970-1982	Авторы приходят к выводу, что IL11 защищает от гипероксического индуцированного поражения легких, основываясь на эффектах сверхэкспрессии IL11 человека, специфичной для легких, у мышей.

Таблица 3

Список публикаций из клинических исследований, в которых rhIL11 вводили пациентам, основываясь главным образом на предполагаемом защитном эффекте применения rhIL11 в моделях заболеваний на грызунах

<i>Herrlinger et al. 2006. "Randomized, Double Blind Controlled Trial of Subcutaneous Recombinant Human Interleukin-11 versus Prednisolone in Active Crohn's Disease." The American Journal of Gastroenterology 101 (4): 793–797.</i>	RhIL11 (1 мг, еженедельно в течение 12 недель, п/к) вводили 51 пациенту с активной болезнью Крона, и было обнаружено, что он значительно уступает лечению преднизолоном.
<i>Lawitz et al. 2004. "A Pilot Study of Interleukin-11 in Subjects with Chronic Hepatitis C and Advanced Liver Disease Nonresponsive to Antiviral Therapy." The American Journal of Gastroenterology 99 (12): 2359–64.</i>	RhIL11 (5 мкг/кг, ежедневно в течение 12 недель, п/к) вводили 20 пациентам с хроническим гепатитом С и поздней стадией болезни печени. К концу исследования наблюдался более низкий сывороточный уровень АЛТ. Наиболее распространенным побочным действием является отек нижних конечностей, который наблюдался у всех субъектов.
<i>Sands et al. 2002. "Randomized, Controlled Trial of Recombinant Human Interleukin-11 in Patients with Active Crohn's Disease." Alimentary Pharmacology &amp; Therapeutics 16 (3): 399–406.</i>	RhIL11 (15 мкг/кг, еженедельно в течение 6 недель, п/к) вводили 49 пациентам с болезнью Крона. Большая доля пациентов, получавших rhIL11, достигла ремиссии по сравнению с плацебо. Наблюдались побочные действия, включая отек.
<i>Moreland et al. 2001. "Results of a Phase-III Randomized, Masked, Placebo-Controlled Trial of Recombinant Human Interleukin-11 (rhIL-11) in the Treatment of Subjects with Active Rheumatoid Arthritis." Arthritis Research 3 (4): 247–252.</i>	Введение до 15 мкг/кг rhIL11 еженедельно в течение 12 недель (п/к) пациентам с ревматоидным артритом является безопасным, но терапевтического эффекта не наблюдалось. Кроме того, у 60,6% пациентов, получавших rhIL11, наблюдался легкое побочное действие (эритема с уплотнением/без него) в месте инъекции.
<i>Trepicchio et al. 1999. "Interleukin-11 Therapy Selectively Downregulates Type I Cytokine Proinflammatory Pathways in Psoriasis Lesions." The Journal of Clinical Investigation 104 (11): 1527–1537.</i>	Пациенты с обширным псориазом получали 2,5 или 5 мг/кг rhIL11 (ежедневно в течение 8 недель, п/к). Ответ (экспрессия РНК воспалительных маркеров) наблюдался в подгруппе (n=7) из 12 пациентов; остальные 5 пациентов не отвечали на лечение, и улучшения не наблюдалось.

Авторы изобретения предлагают усовершенствованный механизм токсичности АРАР, при котором поврежденные NARQI митохондрии продуцируют АФК, которые стимулируют IL11-зависимую активацию NOX4 и дополнительную устойчивую выработку АФК (фиг. 29). Это приводит к двойной патологии: уничтожению гепатоцитов посредством JNK и активации каспазы и предотвращению регенерации гепатоцитов посредством механизмов, которые еще предстоит определить. Мышиная модель AILI близко напоминает заболевание человека, и, таким образом, ожидается, что терапия, нацеленная на передачу сигналов IL11, будет полезна для лечения пациентов с индуцированной АРАР гепатотоксичностью. Поскольку нейтрализующие IL11 препараты не зависят от изменения метаболизма АРАР (фиг. 12F) и специфично стимулируют регенерацию тканей, они эффективны на значительно более поздней стадии, чем текущий стандарт лечения, и могут быть особенно полезны для пациентов, поздно поступающих в отделение неотложной помощи.

#### 6.11. Материалы и методы для примера 6.

##### Антитела.

Расщепленная каспаза 3 (9664, CST), каспаза 3 (9662, CST), циклин D1 (55506, CST), циклин D3 (2936, CST), циклин E1 (20808, CST), p-ERK1/2 (4370, CST), ERK1/2 (4695, CST), GAPDH (2118, CST), GFP (ab6673, Abcam), IgG (Aldevron), p-JNK (4668, CST), JNK (9258, CST), нейтрализующее антитело к IL11RA (X209, Aldevron; исследование in vivo), IL11RA (130920, Санта-Круз; WB), NOX4 (110-58849, Novus Biologicals), PCNA (13110, CST), p-RB (8516, CST), RB (9313, CST), антитело против антитела кролика HRP (7074, CST), антитело против антитела мыши HRP (7076, CST), антитело против антитела кролика Alexa Fluor 488 (ab150077, Abcam), антитело против антитела кролика Alexa Fluor 647 (ab150079, Abcam), антитело против антитела мыши Alexa Fluor 488 (ab150113, Abcam), антитело против антитела козы Alexa Fluor 488 (ab150129, Abcam).

##### Рекомбинантные белки.

Рекомбинантный IL11 человека (rhIL11, UniProtKB:P20809, Genscript), рекомбинантный IL11 мыши (rmIL11, UniProtKB: P47873, Genscript), IL11RA человека (10252-H08H, SinoBiological), IL11RA мыши (50075-M08H, SinoBiological).

##### Химические вещества.

Ацетаминофен (APAP, A3035, Sigma), DAPI (D1306, ThermoFisher Scientifics), D-люциферин (L6882, Sigma), GKT-137831 (17764, Cayman Chemical), N-ацетил-L-цистеин (NAC, A7250, Sigma).

##### Реагенты для ЖХ-МС/МС.

Эталонный стандарт ацетаминофена (APAP, P0300000, Sigma), внутренний стандарт (IS) ацетаминофена-d4 (APAP-D4, A161222, Toronto Research Chemicals), IS ацетаминофена глутатиона (APAP GLUT, A161223, Toronto Research Chemicals), ацетонитрил (900667, Sigma), формиат аммония (A115-50, Sigma), муравьиная кислота (F0507, Sigma), сыворотка мыши (IGMSCD1SER50ML, i-DNA Biotechnology). Все химические вещества, реагенты и растворители были класса качества ЖХ-МС.

Модельные животные.

Процедуры на животных были одобрены и проводились в соответствии с правилами Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC) SingHealth. Всем мышам давали пищу и воду без ограничений, за исключением периода голодания, в течение которого давали только воду без ограничений.

Мышиные модели отравления ацетаминофеном.

Перед АРАР самцы мышей в возрасте 12-14 недель (C57BL6/NTAC, если не указано иное) голодали в течение ночи. Затем мышам вводили тяжелую ( $400 \text{ мг кг}^{-1}$ ) или летальную ( $550 \text{ мг кг}^{-1}$ ) дозу АРАР путем внутрибрюшинного (в/б) введения. Мышам вводили антитело к IL11RA (X209) или изотипическое контрольное антитело IgG в разное время и в разных дозах, как описано выше или в легендах фигур. Мышей умерщвляли в различные моменты времени после АРАР, от 10 ч до 8 дней, как описано выше или в легендах фигур.

Мыши с IL11-люциферазой.

Ген IL11 мыши состоит из 5 экзонов, причем стартовый кодон ATG находится в экзоне 1, а стоп-кодон TGA - в экзоне 5. Были идентифицированы три транскрипта IL11 мыши (ENSMUSG00000004371): транскрипт IL11-201 является самым длинным и кодирует пропептид из 199 амк, тогда как транскрипты IL11-202 и IL11-203 содержат альтернативный первый экзон и предположительно оба кодируют более короткую изоформу из 140 амк, которая не содержит сигнального пептида. С помощью методики CRISPR/Cas9 была введена последовательность Kozak-люцифераза-WPRE-polyA для замены стартового кодона ATG в экзоне 1 IL11-201 (ENSMUST00000094892.11), что привело к нарушению трансляции этого конкретного транскрипта. Одиночные гидовые РНК (огРНК) с сайтами распознавания в экзоне 1 вместе с Cas9 и нацеливающей конструкцией, содержащей последовательность Kozak-люцифераза-WPRE-polyA, с помощью микроинъекции вводили в оплодотворенные зиготы и затем переносили псевдобеременным мышам (Shanghai Model Organisms Center, Inc). Вставка кассеты люциферазы в локус гена IL11 была подтверждена путем секвенирования. Мутантные потомки IL11-люциферазы генерировали на фоне C57BL/6 и идентифицировали с помощью генотипирования для обнаружения вставки конструкции люциферазы в экзон 1, используя праймеры, амплифицирующие область 818 п.н., соответствующую аллелю IL11 дикого типа (5'-GGAGGGAGGGGACGCCAATGACC-3' (SEQ ID NO: 22) и 5'-TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG-3' (SEQ ID NO: 23)), и второй набор праймеров, амплифицирующих область 928 п.н., соответствующую целевому аллелю, содержащему конструкцию люциферазы (5'-AATTCCGTGGTGTGTCG-3' (SEQ ID NO: 24) и 5'-TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG-3' (SEQ ID NO: 25)).

Гетерозиготных мышей с IL11-люциферазой подвергали индуцированному АРАР поражению печени, как описано выше. Через 24 ч мышам внутрибрюшинно инъецировали  $150 \text{ мг кг}^{-1}$  D-люциферина в PBS, и затем получали биолюминесцентные изображения печени с использованием системы IVIS Lumina (Perkin Elmer), в соответствии с инструкциями производителя.

Мыши IL11-EGFP.

Трансгенные мыши с конститутивным нокином EGFP в гене IL11 были получены компанией Syagen Biosciences Inc. Вкратце, получали мышей с нокином, которые содержали кассету 2A-EGFP, вставленную в экзон 5, которая заменяет последовательность стоп-кодона TGA, и трансляция целевого транскрипта у которых приводила к получению полноразмерного пропептида IL11 и EGFP, разделенных саморасщепляющимся пептидным линкером 2A. Гомологичные плечи нацеливающего вектора для гена IL11, содержащие кассету NEO, вставленную в интрон 4 (фланкированную SDA: сайтами самоудаляющихся якорей), и кассету 2A-EGFP, вставленную в экзон 5, были получены с помощью ПЦР с использованием ВАС-клонов из библиотеки C57BL/6. Эмбриональные стволовые клетки C57BL/6 использовали для нацеливания на ген, и успешно нацеленные клоны инъецировали в эмбрионы альбиноса C57BL/6, которые затем повторно имплантировали псевдобеременным самкам CD-1. Животных-основателей идентифицировали по цвету их шерсти, а передачу зародышевой линии подтверждали путем скрещивания с самками C57BL/6 и последующего генотипирования потомства. Были разработаны генотирующие праймеры для амплификации выбранных областей интрона 4, охватывающих сайты SDA кассеты NEO, в соответствии со следующими последовательностями праймеров: (5'-GAAATGAGAGCCTAGAGTCCAGAG-3' (SEQ ID NO: 26) и 5'-GAGGCTTGGGAAGATGCACAATTA-3' (SEQ ID NO: 27)).

Мыши со сверхэкспрессией IL11, специфичной для гепатоцитов (IL11-Tg). Ранее (15) были описаны мыши, у которых кДНК IL11 мыши была введена в локус Rosa26 под контролем сайтов loxP-Stop-loxP, чтобы обеспечить специфичную для конкретного типа клеток сверхэкспрессию IL11 после вырезания, опосредованного Cre-рекомбиназой. Эти животные доступны от The Jackson Laboratory (C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sortm1(CAG-IL11)Cook/J). Для индукции специфичной экспрессии IL11 в гепатоцитах гетерозиготным IL11-Rosa26 мышам внутривенно (в/в) инъецировали  $4 \times 10^{11}$  копий генома в PBS/мышь (VectorBiolabs) AAV8-ALB-Null (контроль) AAV8-ALB-Cre (IL11-Tg). Печени и сыворотку оценивали через три недели.

Мыши с делецией IL11ra1, специфичной для гепатоцитов.

Недавно были получены и валидированы IL11ra1-фланкированные мыши, у которых экзоны 4-7 гена IL11ra1 были фланкированы сайтами loxP, что обеспечило пространственную и временную делецию IL11ra1 при вырезании, опосредованном Cre-рекомбиназой (Ng et al., Sci Transl Med. (2019) 11(511) pii: eaaw1237). Для индукции специфичной делеции IL11ra1 в гепатоцитах гомозиготным IL11ra1-фланкированным мышам в/в вводили вирус AAV8-ALB-Cre ( $4 \times 10^{11}$  копий генома в PBS/мышь, Vector-Biolabs) через хвостовую вену. Аналогичное количество вируса AAV8-ALB-Null вводили гомозиготным IL11ra1-фланкированным мышам в качестве контролей. Мышам, получавшим AAV8, давали возможность восстановиться в течение трех недель до поражения посредством APAP. Эффективность выключения гена определяли с помощью вестерн-блоттинга печеночного IL11RA.

Культура клеток.

Первичные гепатоциты человека и мыши выращивали и поддерживали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Питательную среду обновляли каждые 2-3 дня, и клетки пассировали при 80% конfluence с использованием стандартных методов трипсинизации. Все эксперименты проводили при низком пассаже клеток (P1-P3). Стимулированные клетки сравнивали с нестимулированными клетками, которые выращивали в течение одинакового времени в тех же условиях, но без стимулирующих факторов.

Первичные гепатоциты человека.

Гепатоциты человека (5200, ScienCell) поддерживали в среде для гепатоцитов (520, ScienCell) с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллин-стрептомицина. Клетки выдерживали в бессывороточных условиях в течение 16 ч до соответствующих стимуляций, как описано выше или в легендах фигур, которые проводили в бессывороточной среде для гепатоцитов в течение 24 ч.

Первичные гепатоциты мыши.

Гепатоциты мыши (ABC-TC3928, AcceGen Biotech) поддерживали в среде для гепатоцитов мыши (ABC-TM3928, AcceGen Biotech) с добавлением 1% пенициллин-стрептомицина. Клетки стимулировали различными условиями обработки в течение 24 ч, как описано выше или в легендах фигур.

Трансфекция миРНК.

Первичные гепатоциты человека высевали при 60-70% конfluence в 6-луночный планшет, за 16 ч до трансфекции. Клетки трансфицировали 50 нМ миРНК NOX4 (миРНК ON-TARGETplus SMART-pool, L-010194-00-0005, Dharmascon) или контрольной миРНК (D-001810-10-05, Dharmascon) в течение 24 ч при 37°C в OptiMEM (31985070, Thermo Fisher), содержащей реагент для трансфекции Lipofectamine RNAiMAX (13778150, Thermo Fisher). Трансфицированные клетки затем стимулировали rhIL11 в течение 24 ч. Эффективность выключения гена определяли с помощью иммуноблоттинга NOX4.

Проточная цитометрия.

Первичные гепатоциты человека ( $5 \times 10^5$ ) окрашивали с использованием набора для определения апоптоза мертвых клеток FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (V13242, Thermo Fisher) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки PI<sup>+</sup>ve количественно определяли с помощью проточного цитометра (Fortessa, BD Biosciences) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии 7 (TreeStar).

Колориметрические анализы.

Уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) или аспаратаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке мышей и супернатанте гепатоцитов измеряли с использованием наборов для анализа активности АЛТ (ab105134, Abcam) или АСТ (ab105135, Abcam). Измерения глутатион сульфгидрида (GSH) в печени проводили с использованием набора для колориметрического обнаружения глутатиона Glutathione Colorimetric Detection Kit (E1AGSHC, Thermo Fisher). Все колориметрические анализы проводили в соответствии с протоколом производителя.

Иммуноферментный анализ (ELISA).

Уровни IL11 в сыворотке крови мышей и супернатанте гепатоцитов количественно определяли с использованием набора Mouse IL11 DuoSet (DY418 и DY008, R&D Systems) и набора Human IL-11 Quantikine ELISA kit D1100, R&D Systems), соответственно, в соответствии с протоколом производителя.

Конкурентный ELISA.

IL11RA мыши ( $1 \text{ мкг мл}^{-1}$  в PBS) покрывали 96-луночный планшет (на ночь при 4°C), а затем блокировали блокирующим буфером (1%BSA в PBS, содержащем 0,05% Tween20).

Биотинилированный IL11 мыши получали с использованием набора Lightning-Link Rapid Biotin type A kit (Expedeon) в соответствии с инструкциями производителя. RhIL11 или rmIL11 дважды последовательно разводили в блокирующем буфере (начиная с  $5 \text{ мкг мл}^{-1}$ ) и смешивали с  $0,01 \text{ мкг мл}^{-1}$  биотинилированного IL11 мыши. Смесь биотинилированного IL-11 мыши и либо rhIL11, либо rmIL11 добавляли в планшет с покрытием и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Цвет проявляли путем добавления стрептавидин-HRP (1:1000 в блокирующем буфере) и раствора хромогена ТМВ (002023, ThermoFisher Scientific).

Иммуноблоттинг.

Вестерн-блоты проводили на лизатах гепатоцитов и ткани печени. Гепатоциты и ткани гомогенизировали в буфере для радиоиммунопреципитационного анализа (RIPA), содержащего ингибиторы протеа-

зы и фосфатазы (Thermo Fisher), с последующим центрифугированием для осветления лизата. Концентрации белка определяли методом Бредфорда (Bio-Rad). Равные количества белковых лизатов разделяли с помощью SDS-PAGE, переносили на мембрану из ПВДФ и подвергали иммуноблоттинговому анализу на указанные первичные антитела. Белки визуализировали с использованием системы детектирования ECL (Pierce) с соответствующими вторичными антителами.

Количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР).

Тотальную РНК экстрагировали либо из быстрозамороженных тканей печени, либо из лизатов гепатоцитов с использованием Trizol (Invitrogen) с последующей очисткой на колонке RNeasy (Qiagen). кДНК синтезировали с помощью набора для синтеза кДНК iScript™ (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ экспрессии генов проводили на двух параллельных образцах с использованием технологии TaqMan (Applied Biosystems) или fast SYBR green (Qiagen) с использованием StearOnePlus™ (Applied Biosystem) в течение 40 циклов. Данные экспрессии нормировали относительно экспрессии мРНК GAPDH, и кратность изменения рассчитывали с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Последовательности специфичных зондов TaqMan и зеленых праймеров SYBR доступны по запросу.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Измерения SPR проводили на BIAcore T200 (GE Healthcare) при 25°C. Перед использованием буферы дегазировали и подвергали стерилизующей фильтрации через фильтры с размером пор 0,2 мкм. RhIL11 или gmIL11 иммобилизовали на сенсорном чипе на основе карбоксиметилированного декстрана (CM5) с использованием стандартной химии связывания аминов. Для кинетического анализа над rhIL11, gmIL11 и референсными поверхностями пропускали серию концентраций (от 3,125 нМ до 100 нМ) IL11RA человека или IL11ra мыши со скоростью потока 40 мкл мин<sup>-1</sup>. Все аналиты растворяли в HBS-EP+ (BR100669, GE Healthcare), содержащем 1 мг мл<sup>-1</sup> BSA. Ассоциацию и диссоциацию измеряли в течение 150 и 200 с, соответственно. После каждой инъекции анализируемого вещества поверхность регенерировали путем 30-секундной инъекции глицина с pH 2,5 с последующим 5-минутным периодом стабилизации. Все сенсограммы были выровнены и были получены с двумя стандартами. Аффинность и кинетические константы определяли путем аппроксимации скорректированных сенсограмм к модели Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения BIAevaluation v3.0 (GE Healthcare). Равновесную константу связывания KD определяли по отношению констант скорости связывания kd/ka.

Гистология.

Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E).

Печени фиксировали в течение 48 ч при комнатной температуре (комн. т.) в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF), обезвоживали, помещали в парафиновые блоки и нарезали на срезы по 7 мкм. Срезы окрашивали H&E в соответствии со стандартным протоколом и исследовали с помощью светового микроскопа.

Окрашивание на EdU.

Печень промывали в холодном PBS и промокивали насухо безворсовой бумагой, и заключали в реагент OCT (4583, Tissue-Tek®). После замораживания реагента OCT образцы печени обертывали алюминиевой фольгой и хранили при -80°C. Погруженные в среду для криотомии печени нарезали на криосрезы (-20°C) толщиной 7 мкм и оставляли высыхать на предметных стеклах в течение 1 ч, прежде чем приступить к обнаружению EdU с использованием набора для визуализации Baseclick's EdU IV Imaging Kit 488L (BCK488-IV-IM-L) в соответствии с протоколом производителя.

Иммунофлуоресцентное окрашивание.

Печени обрабатывали и замораживали, как указано выше (раздел окрашивания на EdU). Замороженные ткани печени нарезали на срезы по 7 мкм при -20°C и оставляли высыхать в течение 1 ч (комн. т.). Срезы печени фиксировали в холодном ацетоне в течение 15 мин перед кратковременной промывкой PBS, пермеабилizировали 0,1% TritonX-100 (T8787, Sigma) и блокировали 2,5% нормальной козьей сыворотки (S-1012, Vector Labs) в течение 1 ч (комн. т.). Срезы печени инкубировали с первичными антителами к GFP (1:500) и каспазе 3 (1:1000) в течение ночи (4°C) с последующей инкубацией с соответствующими вторичными антителами Alexa Fluor 488/647 (1:250) в течение 1 ч (комн. т.). Для окрашивания ядер перед визуализацией с помощью флуоресцентного микроскопа (Leica) использовали DAPI.

ЖХ-МС/МС.

Образцы сыворотки мыши (20 мкл), градуировочные стандарты и контроли качества переносили в 96-луночный планшет с глубокими лунками, затем добавляли 50 мкл 10 мкг л<sup>-1</sup> тяжелых изотопных стандартов APAP-D4. После обработки 360 мкл ледяного ацетонитрила, содержащего 0,1% муравьиной кислоты, планшет перемешивали (1000 об/мин мин<sup>-1</sup>, 10 мин) с последующим центрифугированием (2270 г, 50 мин, 4°C). 140 мкл супернатанта осторожно переносили на 96-микролуночный планшет и загружали в автоматический дозатор для анализа с помощью ЖХ-МС/МС. Количество ионов затем нормировали относительно количества тяжелого изотопного стандарта перед использованием калибровочной кривой для количественного определения. Жидкостное хроматографическое (ЖХ) разделение биомаркеров проводили на ЖХ системе Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies) с покрытой ПЭЭК ВЭЖХ-колонкой SeQuant®ZIC®-cHILIC 3 мм, 100Å 100×2,1 мм (Merck Pte Ltd), поддерживаемой при 40°C. Ор-

ганический растворитель представлял собой ацетонитрил, содержащий 0,1% муравьиной кислоты (растворитель А), а водный растворитель представлял собой 20 мМ формата аммония, рН 4,0 (растворитель В). Линейный градиент ЖХ на бинарном насосе А (G7120A, Agilent Technologies) был настроен с процентом растворителя В следующим образом: 10% с 0 мин, 70% с 9 мин, 70% с 11 мин и 10% между 11,1 и 11,5 мин, со скоростью потока 0,4 мл мин<sup>-1</sup>. Колонку дополнительно уравнивали в течение 11,5 мин 10% растворителем В. Дополнительный высокоскоростной насос, двухканальный насос В, вместе с быстросменной головкой клапана, 2-позиционный/10-портовый, 1300 бар (5067-4240, Agilent), использовали для уменьшения времени цикла путем поочередной автоматической регенерации колонки. Процент растворителя В на двухканальном насосе В поддерживали на уровне 10% со скоростью потока 0,3 мл мин<sup>-1</sup>. Для масс-обнаружения элюент ЖХ был соединен с системой МС Agilent 6495 Triple Quadrupole MS (G6495A, Agilent Technologies), работающей с источником электрораспыления в режиме положительной или отрицательной ионизации. Условия источника ионизации электрораспылением были следующими: капиллярное напряжение 4,0 кВ, напряжение форсунки 500 В, параметр iFunnel высокое/низкое давление RF 90 В, давление небулайзера 60 фунтов на кв. дюйм, температура газа 290°C, температура газа в оболочке 350°C, небулайзер - 35 фунтов на кв. дюйм, и поток газа в оболочке 12 л/мин<sup>-1</sup>. Условия мониторинга множественных реакций (MRM), использованные для АРАР и АРАР-D4, составляли 152,1→110 с энергией столкновения (CE) 16eV, напряжением ускорителя столкновения (CAV) 5 В и 156→114 с CE 8eV и CAV 5 В, соответственно. MRM, использованный для АРАР-глутатиона, составлял 457,1→140 с энергией столкновения (CE) 42eV, напряжением ускорителя столкновения (CAV) 5 В.

Градуировка и линейность.

Десятичные градуировочные кривые были получены путем добавления в не содержащую лекарственных средств сыворотку мыши рабочих растворов АРАР и АРАР-глутатиона. Конечные концентрации АРАР составляли 0,32, 0,46, 2,6, 5,2, 10,3, 20,6, 41,3, 82,5 и 330 мг л<sup>-1</sup> (нижний контроль качества: 1,29 мг л<sup>-1</sup>; верхний контроль качества: 165 мг л<sup>-1</sup>). Конечные концентрации АРАР-глутатиона составляли 0,244, 0,49, 0,98, 1,95, 3,91, 7,81, 15,6, 62,5, 125 и 250 мг л<sup>-1</sup> (нижний контроль качества: 1,95 мг л<sup>-1</sup>; верхний контроль качества 31,3 мг л<sup>-1</sup>). Градуировочные кривые соответствовали соотношению площадей пиков каждого анализируемого вещества по отношению к IS с использованием линейной регрессии методом взвешенных наименьших квадратов (1/х<sup>2</sup>) для АРАР и (1/х) для АРАР-глутатиона, коэффициенты линейности определения (r<sup>2</sup>) составляли 0,97807145 и 0,99655914, соответственно. Прецизионность и точность анализа в образцах сыворотки мыши определяли, как описано ранее (32).

Статистический анализ.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 6.07). Р-значения корректировали для множественного тестирования по Даннету (когда несколько экспериментальных групп сравнивали с одним условием), Тьюки (когда несколько условий сравнивали друг с другом в рамках одного эксперимента), Сидуку (когда несколько условий из 2 разных генотипов сравнивали друг с другом). Анализ двух параметров для сравнения двух разных групп проводили с помощью двустороннего ANOVA. Кривые выживаемости анализировали с помощью критерия Гехана-Бреслоу-Вилкоксона. Критерий статистической значимости представлял собой Р<0,05.

## 6.12. Цитируемые источники примера 6.

1. W. Bernal, J. Wendon, Acute liver failure. *N. Engl. J. Med.* 370 (2014), pp. 1170–1171.
2. W. M. Lee, L. S. Hynan, L. Rossaro, R. J. Fontana, R. T. Stravitz, A. M. Larson, T. J. Davern 2nd, N. G. Murray, T. McCashland, J. S. Reisch, P. R. Robuck, Acute Liver Failure Study Group, Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure. *Gastroenterology*. 137, 856–64, 864.e1 (2009).
3. H. Jaeschke, Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Dig. Dis.* 33, 464–471 (2015).
4. A. L. Chiew, C. Gluud, J. Brok, N. A. Buckley, Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD003328 (2018).
5. S. Win, T. A. Than, J. Zhang, C. Oo, R. W. M. Min, N. Kaplowitz, New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology*. 67, 2013–2024 (2018).
6. H. Zhang, J. Cook, J. Nickel, R. Yu, K. Stecker, K. Myers, N. M. Dean, Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Biotechnol.* 18, 862–867 (2000).
7. R. F. Schwabe, T. Luedde, Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 738–752 (2018).
8. B. K. Gunawan, Z. Liu, D. Han, N. Hanawa, W. A. Gaarde, N. Kaplowitz, c-Jun N-Terminal Kinase Plays a Major Role in Murine Acetaminophen Hepatotoxicity. *Gastroenterology*. 131 (2006), pp. 165–178.
9. Y. Xie, A. Ramachandran, D. G. Breckenridge, J. T. Liles, M. Lebofsky, A. Farhood, H. Jaeschke, Inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase 1 protects against acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 286, 1–9 (2015).
10. S. Sekiya, A. Suzuki, Glycogen synthase kinase 3  $\beta$ -dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11175–11180 (2011).
11. A. Marcos, R. A. Fisher, J. M. Ham, M. L. Shiffman, A. J. Sanyal, V. A. Luketic, R. K. Sterling, A. S. Fulcher, M. P. Posner, Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation*. 69, 1375–1379 (2000).
12. B. Bhushan, U. Apte, Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Am. J. Pathol.* 189, 719–729 (2019).

13. G. K. Michalopoulos, Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*. 65, 1384–1392 (2017).
14. A. A. Widjaja, B. K. Singh, E. Adami, S. Viswanathan, J. Dong, G. A. D'Agostino, B. Ng, W. W. Lim, J. Tan, B. S. Paleja, M. Tripathi, S. Y. Lim, S. G. Shekeran, S. P. Chothani, A. Rabes, M. Sombetzki, E. Bruinstroop, L. P. Min, R. A. Sinha, S. Albani, P. M. Yen, S. Schafer, S. A. Cook, Inhibiting Interleukin 11 Signaling Reduces Hepatocyte Death and Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis in Mouse Models of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* (2019), doi:10.1053/j.gastro.2019.05.002.
15. S. Schafer, S. Viswanathan, A. A. Widjaja, W.-W. Lim, A. Moreno-Moral, D. M. DeLaughter, B. Ng, G. Patone, K. Chow, E. Khin, J. Tan, S. P. Chothani, L. Ye, O. J. L. Rackham, N. S. J. Ko, N. E. Sahib, C. J. Pua, N. T. G. Zhen, C. Xie, M. Wang, H. Maatz, S. Lim, K. Saar, S. Blachut, E. Petretto, S. Schmidt, T. Putoczki, N. Guimarães-Camboa, H. Wakimoto, S. van Heesch, K. Sigmundsson, S. L. Lim, J. L. Soon, V. T. T. Chao, Y. L. Chua, T. E. Tan, S. M. Evans, Y. J. Loh, M. H. Jamal, K. K. Ong, K. C. Chua, B.-H. Ong, M. J. Chakaramakkil, J. G. Seidman, C. E. Seidman, N. Hubner, K. Y. K. Sin, S. A. Cook, IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature*. 552, 110–115 (2017).
16. S. Cook, B. Ng, J. Dong, S. Viswanathan, G. D'Agostino, A. Widjaja, W.-W. Lim, N. Ko, J. Tan, S. Chothani, B. Huang, C. Xie, A.-M. Chacko, N. Guimaraes-Camboa, S. Evans, A. Byrne, T. Maher, J. Liang, P. Noble, S. Schafer, IL-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis (2018), doi:10.1101/336537.
17. T. Nishina, S. Komazawa-Sakon, S. Yanaka, X. Piao, D.-M. Zheng, J.-H. Piao, Y. Kojima, S. Yamashina, E. Sano, T. Putoczki, T. Doi, T. Ueno, J. Ezaki, H. Ushio, M. Ernst, K. Tsumoto, K. Okumura, H. Nakano, Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci. Signal*. 5, ra5 (2012).
18. M. Zhu, B. Lu, Q. Cao, Z. Wu, Z. Xu, W. Li, X. Yao, F. Liu, IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. *PLoS One*. 10, e0126296 (2015).
19. M. Bozza, J. L. Bliss, R. Maylor, J. Erickson, L. Donnelly, P. Bouchard, A. J. Dorner, W. L. Trepicchio, Interleukin-11 reduces T-cell-dependent experimental liver injury in mice. *Hepatology*. 30, 1441–1447 (1999).
20. W. L. Trepicchio, M. Bozza, P. Bouchard, A. J. Dorner, Protective effect of rhIL-11 in a murine model of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 29, 242–249 (2001).
21. J. Yu, Z. Feng, L. Tan, L. Pu, L. Kong, Interleukin-11 protects mouse liver from warm ischemia/reperfusion (WI/Rp) injury. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 40, 562–570 (2016).
22. K. Maeshima, T. Takahashi, K. Nakahira, H. Shimizu, H. Fujii, H. Katayama, M. Yokoyama, K. Morita, R. Akagi, S. Sassa, A protective role of interleukin 11 on hepatic injury in acute endotoxemia. *Shock*. 21, 134–138 (2004).

23. H. Mühl, STAT3, a key parameter of cytokine-driven tissue protection during sterile inflammation--the case of experimental acetaminophen (Paracetamol)-induced liver damage. *Front. Immunol.* 7, 163 (2016).
24. K. Schleinkofer, A. Dingley, I. Tacke, M. Federwisch, G. Müller-Newen, P. C. Heinrich, P. Vusio, Y. Jacques, A. Grotzinger, Identification of the Domain in the Human Interleukin-11 Receptor that Mediates Ligand Binding. available online at <http://www.idealibrary.com> on *J. Mol. Biol.* 306, 263–274 (2001).
25. C. P. Denton, V. H. Ong, S. Xu, H. Chen-Harris, Z. Modrusan, R. Lafyatis, D. Khanna, A. Jahreis, J. Siegel, T. Somase, Therapeutic interleukin-6 blockade reverses transforming growth factor-beta pathway activation in dermal fibroblasts: insights from the fascinate clinical trial in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 77, 1362–1371 (2018).
26. A. Bettaieb, J. X. Jiang, Y. Sasaki, T.-I. Chao, Z. Kiss, X. Chen, J. Tian, M. Katsuyama, C. Yabe-Nishimura, Y. Xi, C. Szyndralewicz, K. Schröder, A. Shah, R. P. Brandes, F. G. Haj, N. J. Török, Hepatocyte Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced Oxidase 4 Regulates Stress Signaling, Fibrosis, and Insulin Sensitivity During Development of Steatohepatitis in Mice. *Gastroenterology.* 149, 468–80.e10 (2015).
27. M. Walmsley, D. M. Butler, L. Marinova-Mutafchieva, M. Feldmann, An anti-inflammatory role for interleukin-11 in established murine collagen-induced arthritis. *Immunology.* 95, 31–37 (1998).
28. B. S. Qiu, C. J. Pfeiffer, J. C. Keith, Protection by recombinant human interleukin-11 against experimental TNB-induced colitis in rats. *Digestive Diseases and Sciences.* 41 (1996), pp. 1625–1630.
29. T. V. A. Murray, X. Dong, G. J. Sawyer, A. Caldwell, J. Halket, R. Sherwood, A. Quaglia, T. Dew, N. Anilkumar, S. Burr, R. K. Mistry, D. Martin, K. Schröder, R. P. Brandes, R. D. Hughes, A. M. Shah, A. C. Brewer, NADPH oxidase 4 regulates homocysteine metabolism and protects against acetaminophen-induced liver damage in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 918–930 (2015).
30. L. Hecker, R. Vittal, T. Jones, R. Jagirdar, T. R. Luckhardt, J. C. Horowitz, S. Pennathur, F. J. Martinez, V. J. Thannickal, NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat. Med.* 15, 1077–1081 (2009).
31. P. J. Wermuth, F. A. Mendoza, S. A. Jimenez, Abrogation of transforming growth factor- $\beta$ -induced tissue fibrosis in mice with a global genetic deletion of Nox4. *Lab. Invest.* 99, 470–482 (2019).
32. T. Gicquel, J. Aubert, S. Lepage, B. Fromenty, I. Morel, Quantitative Analysis of Acetaminophen and its Primary Metabolites in Small Plasma Volumes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology.* 37 (2013), pp. 110–116.

Пример 7. Экспрессия и передача сигналов рецепторов IL-11 и IL-6 в первичных гепатоцитах человека.

#### 7.1. Введение.

IL11 является членом семейства цитокинов интерлейкина-6 (IL6) и, как и IL6, связывается со своим мембраносвязанным альфа-рецептором (IL11RA) и гликопротеином 130 (gp130) для передачи сигналов в цис. IL6 как таковой был связан с функцией печени, и из публикаций следует в целом благоприятный эффект (Klein et al., 2005; Kroy et al., 2010; Matthews et al., 2010; Schmidt-Arras and Rose-John, 2016; Wuestefeld et al., 2003). Однако также считается, что IL6 может связываться с растворимым рецептором IL6 (sIL6R) и передавать сигнал в транс, который считается дезадаптивным (Schmidt-Arras and Rose-John, 2016). Возможно, что IL11, как и IL6, передает сигналы в патогенном режиме в транс, но в проведенных на сегодняшний день экспериментах не было найдено доказательств этого в опухолях или репродуктивных тканях (Agthe et al., 2017; Balic et al., 2017).

#### 7.2. Результаты.

Авторы изобретения сначала оценили уровни экспрессии IL6R, IL11RA и gp130 в первичных гепатоцитах человека с помощью проточной цитометрии. Устойчивая экспрессия IL11RA и gp130 наблюдалась в подавляющем большинстве клеток (92,6 и 91,9%, соответственно), но только немногие гепатоциты (3,0%) экспрессировали IL6R, и при этом на низких уровнях (фиг. 31А и 32А). В соответствии с этим

результатом в исследованиях RNA-seq и Ribo-seq было обнаружено, что транскрипты IL11RA и gp130 на высоком уровне экспрессируются и активно транслируются в гепатоцитах. Напротив, наблюдалось мало транскриптов IL6R, и практически не наблюдалось обнаруживаемой трансляции IL6R (фиг. 31B-31D, 32B и 32C). Иммунофлуоресцентное окрашивание гепатоцитов подтвердило результаты данных Ribo-seq: высокая экспрессия IL11RA, но отсутствие обнаружимой экспрессии IL6R (фиг. 32D). Авторы изобретения также не обнаружили значимых уровней IL6R в культуральных средах (уровни были чуть выше нижнего предела обнаружения), и поэтому они исключили возможность выделения IL6R (фиг. 32E). В совокупности эти данные показывают, что IL6R в первичных гепатоцитах человека экспрессируется на очень низких уровнях, что подразумевает ограниченную роль передачи цис-сигналов IL6 в этих клетках. Однако эти клетки демонстрируют сильную совместную экспрессию как IL11RA, так и gp130.

Учитывая отсутствие экспрессии IL6R гепатоцитами человека, авторы изобретения использовали синтетическую конструкцию передачи транс-сигналов IL6 (hyperIL6) для активации передачи сигналов IL6 в этих клетках, и сравнили ее с синтетическим транс-сигнальным комплексом IL11 (hyperIL11). HyperIL11, как и сам IL11 (см. пример 6), активировал ERK и JNK дозозависимым образом (от 2,5 нг/мл до 20 нг/мл). Напротив, передача транс-сигналов IL6 не активировала неканонические сигнальные пути, а вместо этого индуцировала дозозависимую активацию STAT3 (фиг. 31E). Таким образом, IL11 или IL6 в предварительно сформированном синтетическом комплексе со своими родственными рецепторами активируют разные внутриклеточные пути при связывании с gp130 на гепатоцитах, что является новым и занимательным открытием.

HyperIL11 вызывал дозозависимое повышение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) в среде первичных культур гепатоцитов человека, тогда как было обнаружено, что hyperIL6 (20 нг/мл) обладает значительным, хотя и ограниченным, цитопротекторным эффектом (кратность изменения (FC)=0,9; P=0,0468) (фиг. 31F). Растворимый gp130 (sgp130) является ингибитором транс-сигнальных комплексов, действующих через gp130 (Schmidt-Arras and Rose-John, 2016). В соответствии с описанными для него эффектами ловушки, sgp130 блокировал активацию сигнальных путей ниже как hyperIL11 (p-ERK/p-JNK), так и hyperIL6 (p-STAT3), а также ингибировал гепатотоксические эффекты hyperIL11 (фиг. 31G-31I).

Затем авторы изобретения провели эксперименты с целью обнаружения передачи транссигналов IL11 в отсутствие искусственных белковых комплексов hyperIL6 или hyperIL11. Клетки стимулировали IL11 в присутствии либо растворимого gp130 (sgp130, для ингибирования предполагаемой передачи транс-сигналов), либо растворимого IL11RA (sIL11RA, для усиления предполагаемой передачи транс-сигналов). Индуцированная IL11 гибель гепатоцитов и передача сигналов не были затронуты sgp130 или sIL11RA (фиг. 31J-31K и 32F). Кроме того, IL11 дозозависимым образом (от 0,625 нг/мл до 20 нг/мл) вызывал гибель гепатоцитов, на которую не влияло добавление sgp130 (1 мкг/мл) или sIL11RA (1 мкг/мл) (фиг. 32G). Соответственно, увеличение доз sgp130 или sIL11RA не оказывало влияния на высвобождение АЛТ из IL11-стимулированных гепатоцитов (фиг. 32H). Эти данные дают основания полагать, что передача транс-сигналов IL11 не может существовать в отсутствие синтетических конструкций.

### 7.3. Материалы и методы для примера 7.

#### Антитела.

Альбумин (ab207327, Abcam), вторичное антитело Alexa Fluor 488 (ab50077, Abcam), p-ERK1/2 (4370, CST), ERK1/2 (4695, CST), gp130 (PA5-28932, Thermo Fisher), IL6 (AF506, R&D systems), IL6R (проточная цитометрия, ab222101, Abcam), IL6R (для иммунофлуоресцентного окрашивания, MA1-80456, Thermo Fisher), IL11 (Aldevron), IL11RA (проточная цитометрия и иммунофлуоресцентное окрашивание, ab125015, Abcam), IL11RA (western blot, 130920, Santa Cruz), p-JNK (4668, CST), JNK (9258, CST), p-STAT3 (4113, CST), STAT3 (4904, CST), антитело мыши HRP (7076, CST), антитело кролика HRP (7074, CST).

#### Рекомбинантные белки.

Коммерческие рекомбинантные белки: hyperIL6 человека (слитый белок IL6R:IL6, 8954-SR, R&D systems), растворимый Fc gp130 человека (671-GP-100, R&D systems), IL11RA человека (8895-MR-050, R&D systems). Изготовленные на заказ рекомбинантные белки: IL11 человека (UniProtKB:P20809, GenScript), hyperIL11 человека (слитый белок IL11RA:IL11), имитирующий транс-сигнальный комплекс, конструировали с использованием фрагмента IL11RA (аминокислотные остатки 1-317; UniProtKB: Q14626) и IL11 (аминокислотные остатки 22-199, UniProtKB: P20809) с линкером из 20 аминокислот (SEQ ID NO: 20; Schafer et al., 2017).

#### Химические вещества.

Параформальдегид (PFA, 28908; Thermo Fisher), форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA, P1585, Sigma), Triton X-100 (T8787, Sigma) и 4',6'-диамидино-2-фенилиндола (D1306; Thermo Fisher).

#### Первичная культура гепатоцитов человека.

Первичные гепатоциты человека (5200, ScienCell) поддерживали в среде для гепатоцитов (520, ScienCell) с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллин-стрептомицина при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Гепатоциты (P2-P3) выдерживали в бессывороточных условиях в течение ночи, если иное не указано в способах, до стимуляции различными дозами различных рекомбинантных белков в течение 24 ч, как

указано в основном тексте и/или легендах фигур.

Культура ТНР-1.

ТНР-1 (ATCC) культивировали в RPMI 1640 (A1049101, Thermo Fisher) с добавлением 10% FBS и 0,05 мМ β-меркаптоэтанола. Клетки ТНР-1 дифференцировали с 10 нг/мл PMA в RPMI 1640 в течение 48 ч.

Проточная цитометрия.

Для анализа поверхностных IL11RA, IL6R и gp130 первичные гепатоциты человека и клетки ТНР-1 окрашивали антителом к IL11RA, IL6R или gp130 и соответствующим вторичным антителом Alexa Fluor 488. Анализ гибели клеток проводили путем окрашивания первичных гепатоцитов человека с помощью набора для определения апоптоза мертвых клеток с помощью аннексина V FITC и PI (V13242, Thermo Fisher). Затем клетки PI<sup>+</sup>ve количественно определяли с помощью проточного цитометра (Fortessa, BD Biosciences) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo версии X (TreeStar).

Иммунофлуоресценция.

Первичные гепатоциты человека высевали на 8-луночные предметные стекла (1,5×10<sup>4</sup> клеток/луночка) за 24 ч до окрашивания. Клетки фиксировали в 4% PFA в течение 20 мин, промывали PBS, а неспецифические сайты блокировали 5% BSA в PBS в течение 2 ч. Клетки инкубировали с антителом к IL11RA, IL6R, gp130 или альбумину в течение ночи (4°C) с последующей инкубацией с соответствующим вторичным антителом Alexa Fluor 488 в течение 1 ч. Предметные стекла с лунками сушили в темноте и добавляли к предметным стеклам 5 капель заливной среды с DAPI за 15 мин до визуализации с помощью флуоресцентного микроскопа (Leica).

РНК-секвенирование РНК (RNA-seq) и рибосомное профилирование (Ribo-seq).

Препараты библиотеки RNA-seq и Ribo-Seq выполняли, как описано ранее (Chothani et al., 2019).

Генерация библиотек RNA-seq.

Тотальную РНК выделяли из гепатоцитов человека с использованием колонок RNeasy (Qiagen). РНК количественно оценивали с использованием набора для анализа высокой чувствительности РНК Qubit (Life Technologies), а ее качество оценивали на основе их индекса целостности РНК с использованием набора реагентов для анализа LabChip GX RNA (Perkin Elmer). Набор TruSeq Stranded mRNA Library Preparation kit (Illumina) использовали для измерения содержания транскриптов, следуя стандартным инструкциям производителя.

Генерация библиотек Ribo-seq.

Гепатоциты выращивали до 90% конfluence в культуральной чашке диаметром 10 см и лизировали в 1 мл холодного буфера для лизиса (состав, как в TruSeq® Ribo Profile Mammalian Kit, RPHMR12126, Illumina) с добавлением 0,1 мг/мл циклогексимида. Затем осуществляли футпринтинг гомогенизированных и очищенных лизатов с помощью нуклеазы Truseq (Illumina) в соответствии с инструкциями производителя. Рибосомы очищали с использованием колонок Illustra Sephacryl S400 (GE Healthcare), а защищенные фрагменты РНК экстрагировали стандартным методом с фенолом:хлороформом:изоамиловым спиртом. После удаления рибосомной РНК (Mammalian RiboZero Magnetic Gold, Illumina) получали библиотеки для секвенирования из футпринта РНК с использованием набора TruSeq® Ribo Profile Mammalian Kit в соответствии с протоколом производителя. Конечные библиотеки RNA-seq и рибосомного профилирования количественно определяли с использованием наборов для количественного определения библиотек KAPA (KAPA Biosystems) в системе ПЦР в реальном времени StepOnePlus (Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя.

Качество и средний размер фрагментов конечных библиотек определяли с использованием набора реагентов LabChip GX DNA High Sensitivity Reagent Kit (Perkin Elmer). Библиотеки с уникальными индексами объединяли и секвенировали на настольном секвенаторе NextSeq 500 (Illumina) с использованием набора NextSeq 500 High Output v2 и метода секвенирования спаренных концов по 75 п.н.

Обработка и анализ данных для РНК-секвенирования и рибосомного профилирования. Необработанные данные секвенирования демультиплексируют с помощью bcl2fastq V2.19.0.316, а адаптеры обрезают с использованием Trimmomatic (Bolger et al., 2014) V0.36, сохраняя после обрезки чтения длиннее 20 нт. Чтения Ribo-seq выравнивали с использованием bowtie (Langmead et al., 2009) с известными последовательностями мтРНК, рРНК и тРНК (RNACentral(The RNACentral Consortium, 2017), выпуск 5.0), и только не выровненные чтения сохраняли как защищенные рибосомами фрагменты (RPF). Выравнивание с геномом человека (hg38) проводили с использованием STAR (Dobin et al., 2012). Экспрессию генов количественно определяли в областях CDS (кодирующая последовательность) для Ribo-seq и экзонных областях для RNA-seq с использованием уникально картированных чтений (выпуск GRCh38 v86 в базе данных Ensembl) с подсчетом признаков (Liao et al., 2014). TPM рассчитывали и визуализировали с помощью коробчатой диаграммы для сравнения исходной экспрессии IL11RA (ENSG00000137070), IL6R (ENSG00000160712) и gp130 (ENSG00000134352). Охват чтений с использованием чтений Ribo-seq и RNA-seq для IL11RA, IL6R и gp130 визуализировали с использованием пакета Gviz R (Hahne and Ivanek, 2016) с файлами выравнивания, специфичного для цепи.

Колориметрические анализы.

Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) в супернатанте клеточной культуры измеряли с использованием набора для анализа активности АЛТ (ab105134, Abcam) в соответствии с протоколом производителя.

Иммуноблоттинг.

Вестерн-блоты проводили на экстрактах тотального белка из гепатоцитов. Лизаты гепатоцитов гомогенизировали в буфере для лизиса и экстракции RIPA (89901, Thermo Scientific), содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз (Roche). Белковые лизаты разделяли с помощью SDS-PAGE и переносили на мембраны из ПВДФ. Белковые полосы визуализировали с использованием системы детектирования ECL (Pierce) с соответствующими вторичными антителами: антителом против антитела кролика HRP или антителом против антитела мыши HRP.

Статистический анализ.

Все статистические анализы проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 6.07). Р-значения корректировали для множественного тестирования в соответствии с Тьюки, когда несколько условий сравнивали друг с другом в рамках одного эксперимента. Критерий статистической значимости был установлен на уровне  $P < 0,05$ .

#### 7.4. Цитируемые источники примера 7.

Agthe, M., Garbers, Y., Putoczki, T., and Garbers, C. (2017). Interleukin-11 classic but not *trans*-signaling is essential for fertility in mice. *Placenta* 57, 13–16.

Balic, J.J., Garbers, C., Rose-John, S., Yu, L., and Jenkins, B.J. (2017). Interleukin-11-driven gastric tumorigenesis is independent of *trans*-signalling. *Cytokine* 92, 118–123.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.

Chothani, S., Schäfer, S., Adami, E., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Langley, S.R., Tan, J., Wang, M., Quaife, N.M., Jian Pua, C., et al. (2019). Widespread Translational Control of Fibrosis in the Human Heart by RNA-Binding Proteins. *Circulation* 140, 937–951.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2012). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.

Hahne, F., and Ivanek, R. (2016). Visualizing Genomic Data Using Gviz and Bioconductor. In *Statistical Genomics*, (Humana Press, New York, NY), pp. 335–351.

Klein, C., Wüstefeld, T., Assmus, U., Roskams, T., Rose-John, S., Müller, M., Manns, M.P., Ernst, M., and Trautwein, C. (2005). The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J. Clin. Invest.* 115, 860–869.

- Kroy, D.C., Beraza, N., Tschaharganeh, D.F., Sander, L.E., Erschfeld, S., Giebeler, A., Liedtke, C., Wasmuth, H.E., Trautwein, C., and Streetz, K.L. (2010). Lack of interleukin-6/glycoprotein 130/signal transducers and activators of transcription-3 signaling in hepatocytes predisposes to liver steatosis and injury in mice. *Hepatology* 51, 463–473.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10, R25.
- Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.
- Matthews, V.B., Allen, T.L., Risis, S., Chan, M.H.S., Henstridge, D.C., Watson, N., Zaffino, L.A., Babb, J.R., Boon, J., Meikle, P.J., et al. (2010). Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia* 53, 2431–2441.
- Schafer, S., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Lim, W.-W., Moreno-Moral, A., DeLaughter, D.M., Ng, B., Patone, G., Chow, K., Khin, E., et al. (2017). IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature* 552, 110–115.
- Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* 64, 1403–1415.
- The RNAcentral Consortium (2017). RNAcentral: a comprehensive database of non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 45, D128–D134.
- Wuestefeld, T., Klein, C., Streetz, K.L., Betz, U., Lauber, J., Buer, J., Manns, M.P., Müller, W., and Trautwein, C. (2003). Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 278, 11281–11288.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение агента, способного ингибировать опосредованную интерлейкином-11 (IL-11) передачу сигналов, при производстве лекарственного средства для применения в способе лечения или предупреждения лекарственного поражения печени (DILI).
2. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанный агент представляет собой агент, способный предотвращать или снижать связывание интерлейкина-11 (IL-11) с рецептором интерлейкина-11 (IL-11R).
3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанный агент способен связываться с интерлейкином-11 (IL-11) или рецептором интерлейкина-11 (IL-11R).
4. Применение по п.3, отличающееся тем, что указанный агент выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, нуклеиновой кислоты, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
5. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанный агент представляет собой антитело к IL-11, являющееся антагонистом опосредованной IL-11 передачи сигналов, или его антигенсвязывающий фрагмент; или указанный агент представляет собой антитело к IL-11R $\alpha$ , являющееся антагонистом опосредованной IL-11 передачи сигналов, или его антигенсвязывающий фрагмент.
6. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанный агент представляет собой рецептор-ловушку для IL-11.
7. Применение по п.6, отличающееся тем, что указанный рецептор-ловушка для IL-11 содержит: (i) аминокислотную последовательность, соответствующую цитокин-связывающей части gp130, и (ii) аминокислотную последовательность, соответствующую цитокин-связывающей части IL-11R $\alpha$ .
8. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанный агент представляет собой мутеин IL-11, при этом необязательно указанный мутеин IL-11 представляет собой W147A.
9. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанный агент представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу, которые способны предотвращать или снижать экспрессию интерлейкина-11 (IL-11) или предотвращать или снижать экспрессию рецептора интерлейкина-11 (IL-11R).
10. Применение по п.9, отличающееся тем, что указанный агент представляет собой антисмысловый

олигонуклеотид, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что указанный антисмысловой олигонуклеотид, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11, представляет собой миРНК, нацеленную на IL11, содержащую последовательность SEQ ID NO: 12, 13, 14 или 15.

12. Применение по п.9, отличающееся тем, что указанный агент представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11R $\alpha$ .

13. Применение по п.12, отличающееся тем, что указанный антисмысловой олигонуклеотид, способный предотвращать или снижать экспрессию IL-11R $\alpha$ , представляет собой миРНК, нацеленную на IL11RA, содержащую последовательность SEQ ID NO:16, 17, 18 или 19.

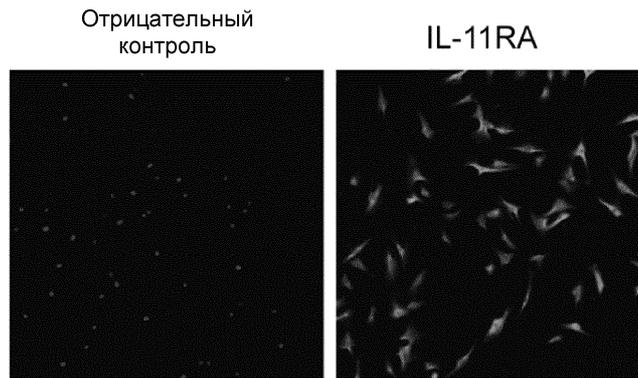
14. Применение по любому из пп.2-13, отличающееся тем, что указанный рецептор интерлейкина-11 представляет собой или содержит IL-11R $\alpha$ .

15. Применение по любому из пп.1-14, отличающееся тем, что лекарственное поражение печени представляет собой индуцированную ацетаминофеном (APAP) гепатотоксичность.

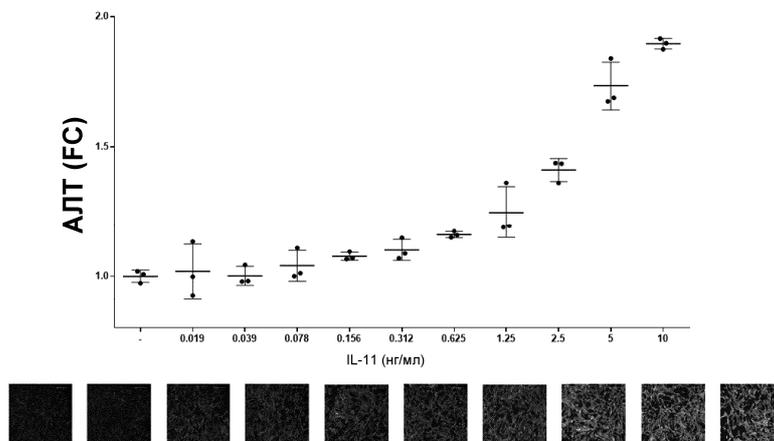
16. Применение по п.15, отличающееся тем, что указанный способ лечения или предупреждения индуцированной APAP гепатотоксичности дополнительно включает лечение N-ацетилцистеином.

17. Применение по любому из пп.1-16, отличающееся тем, что указанный способ лечения или предупреждения включает введение указанного агента субъекту, у которого повышена экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R), необязательно при этом указанный способ включает введение агента субъекту, у которого, как было определено, повышена экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора интерлейкина-11 (IL-11R).

18. Применение по любому из пп.1-17, отличающееся тем, что указанный способ включает определение того, повышена ли экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R) у субъекта, и введение указанного агента субъекту, у которого повышена экспрессия интерлейкина-11 (IL-11) или рецептора IL-11 (IL-11R).

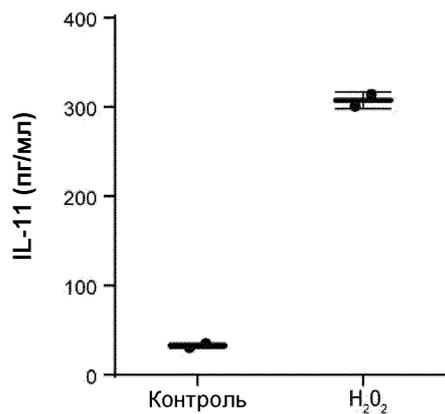


Фиг. 1А



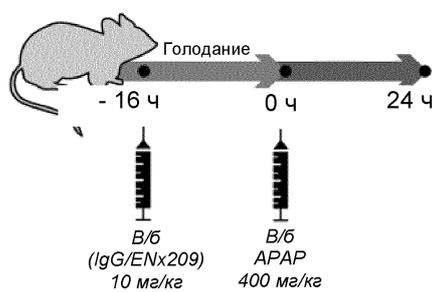
Фиг. 1В

047713

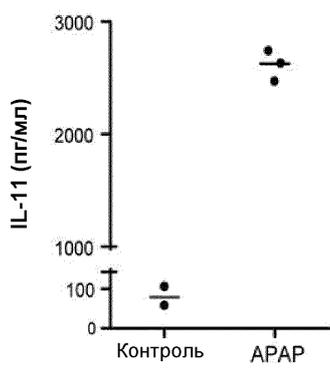


Фиг. 1С

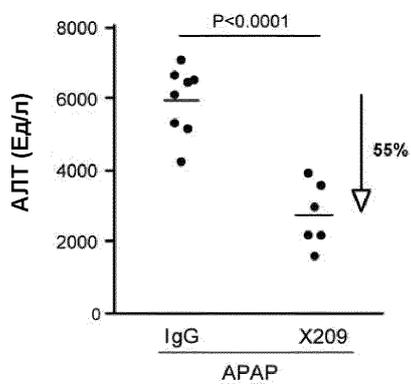
Возраст 12-14 недель – C57BL/6 NTac



Фиг. 2А

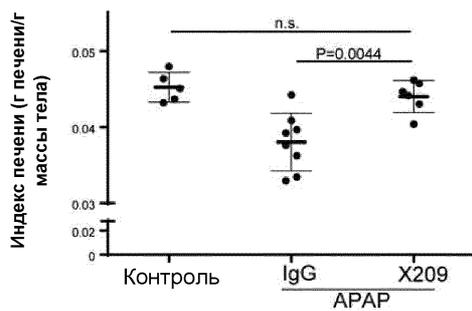


Фиг. 2В

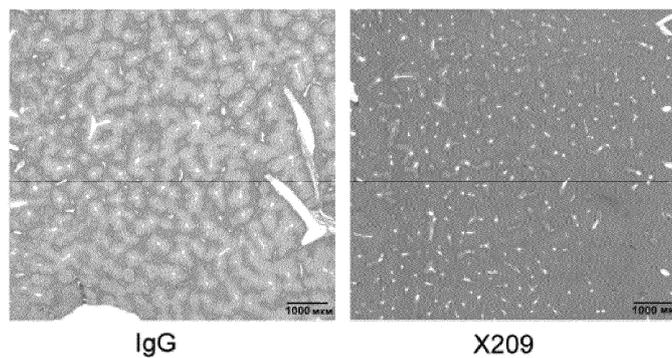


Фиг. 2С

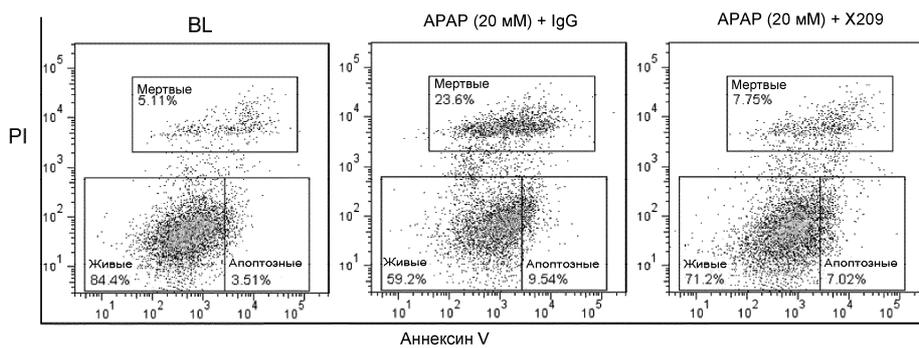
047713



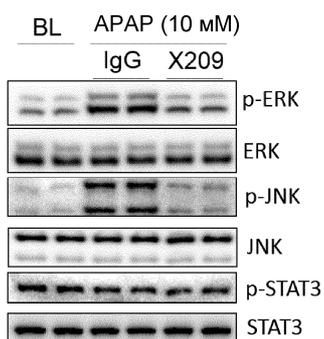
Фиг. 2D



Фиг. 2E

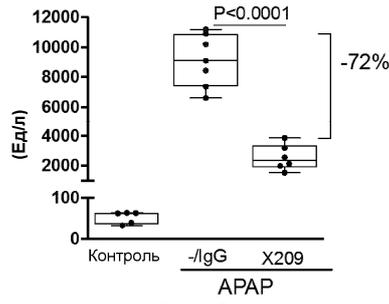


Фиг. 3

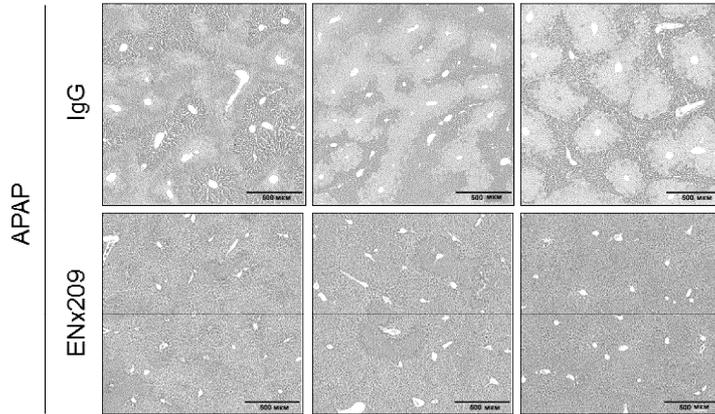


Фиг. 4

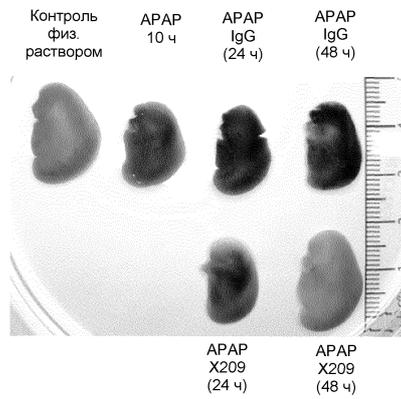
Сывороточная АЛТ



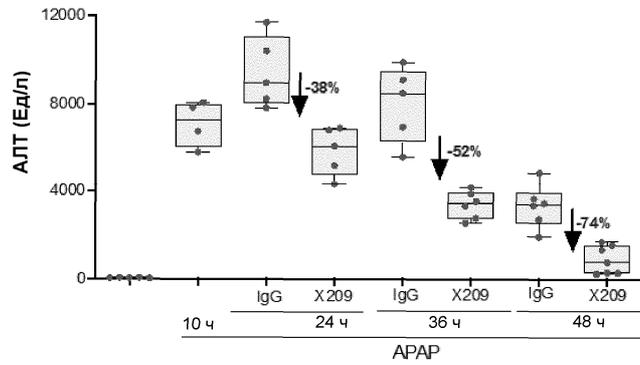
Фиг. 5А



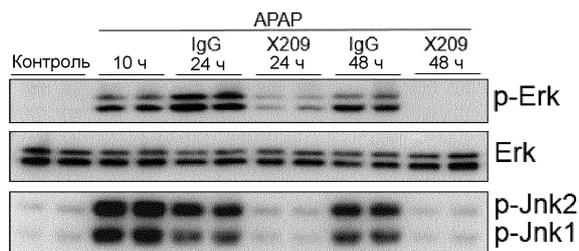
Фиг. 5В



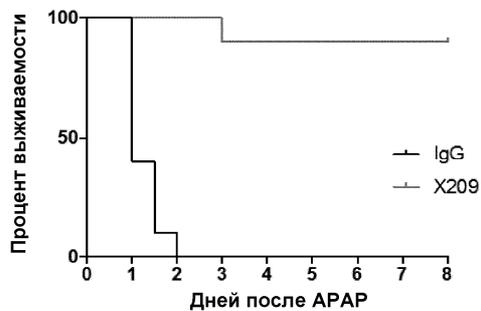
Фиг. 6А



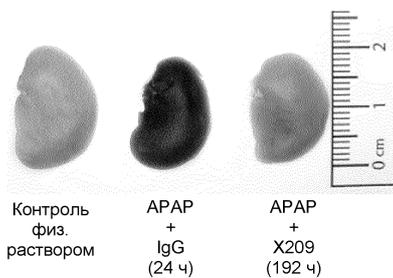
Фиг. 6В



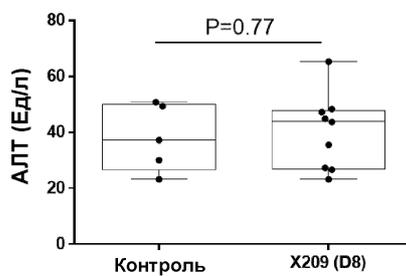
Фиг. 7



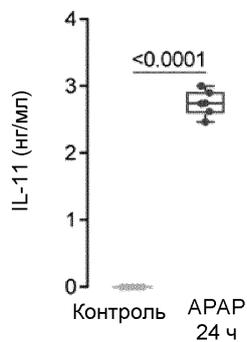
Фиг. 8А



Фиг. 8В

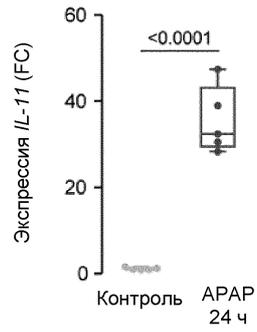


Фиг. 8С

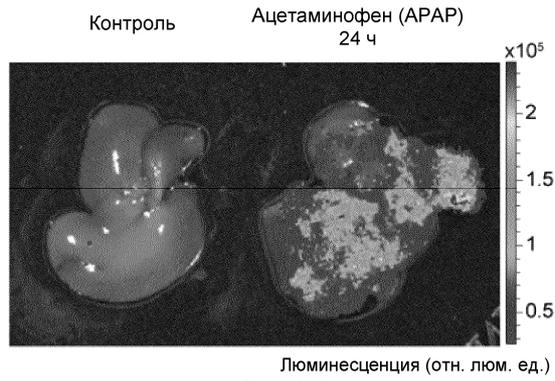


Фиг. 9А

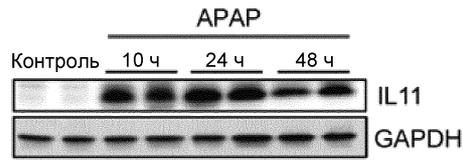
047713



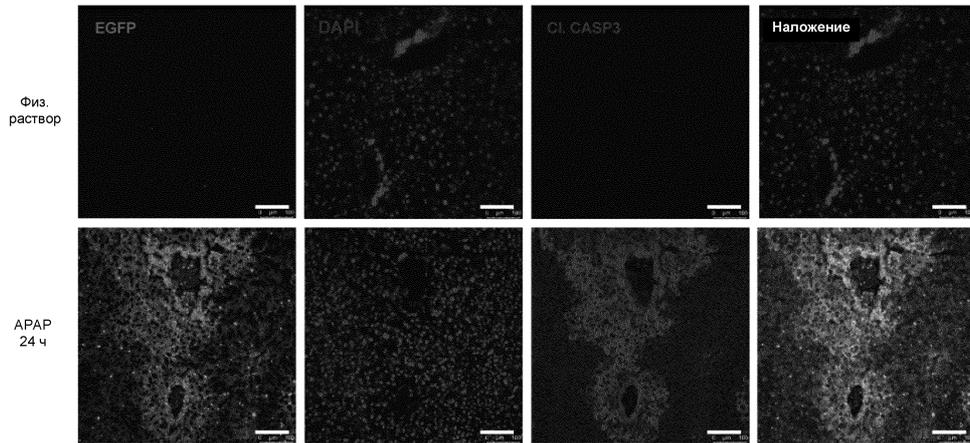
Фиг. 9В



Фиг. 9С

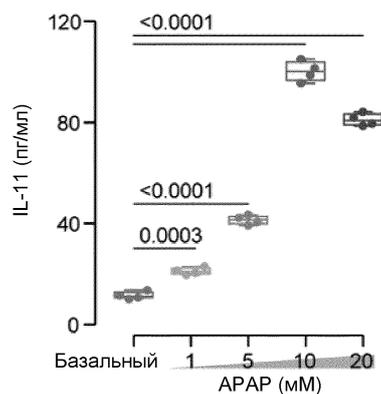


Фиг. 9D

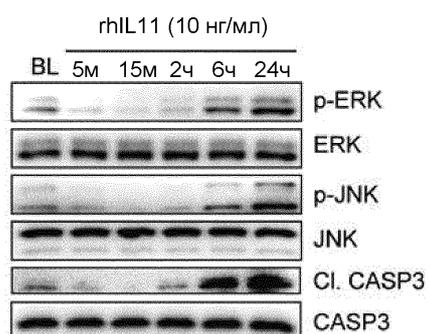


Фиг. 9E

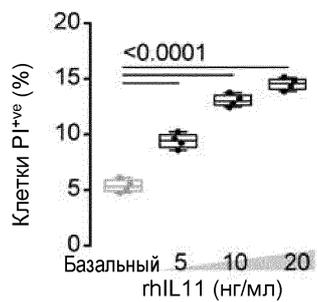
047713



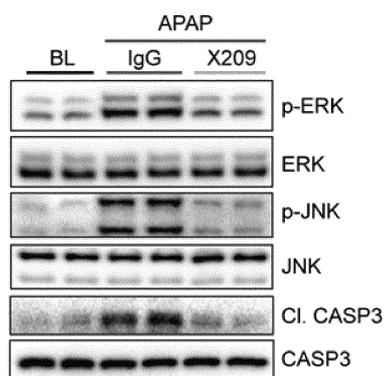
Фиг. 9F



Фиг. 9G

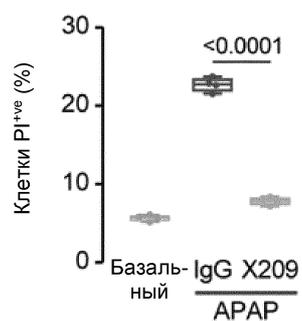


Фиг. 9H



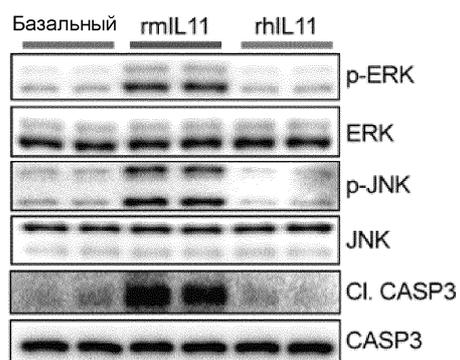
Фиг. 9I

047713

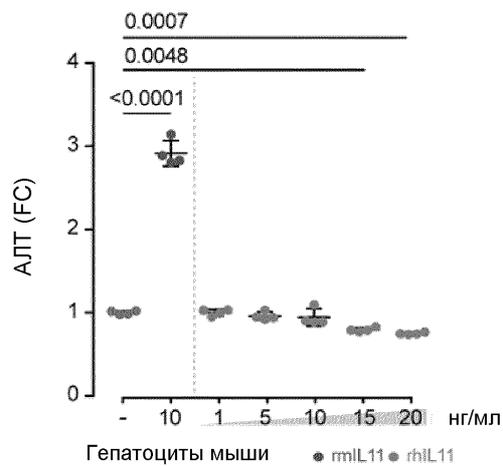


Фиг. 9J

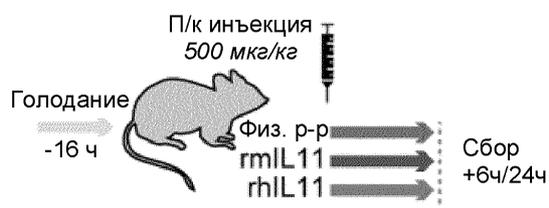
Гепатоциты мыши



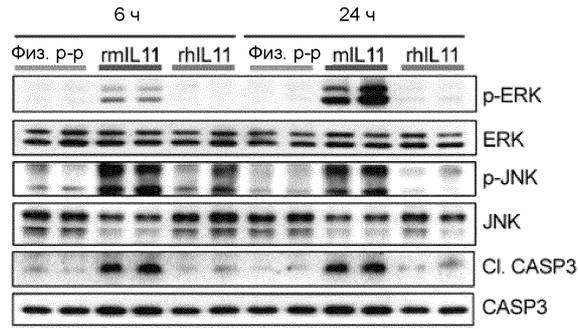
Фиг. 10A



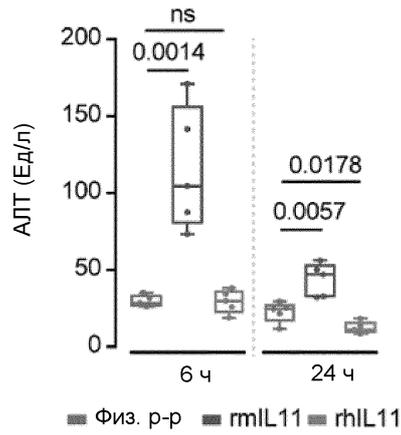
Фиг. 10B



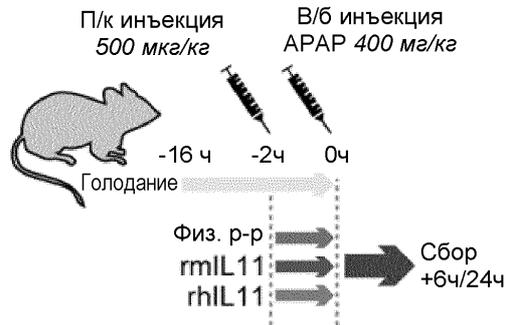
Фиг. 10C



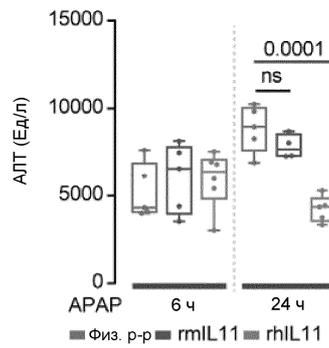
Фиг. 10D



Фиг. 10E

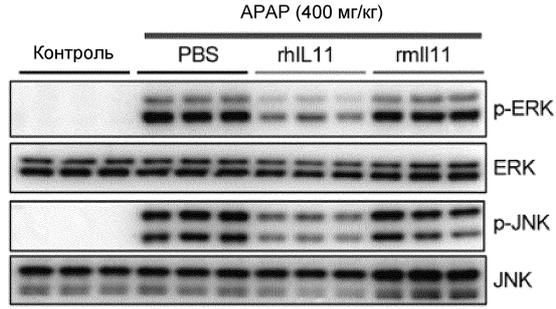


Фиг. 10F

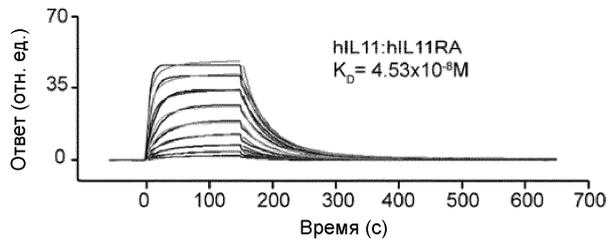
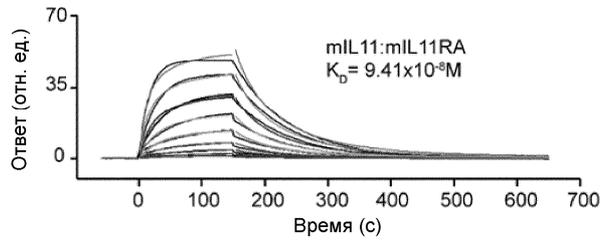
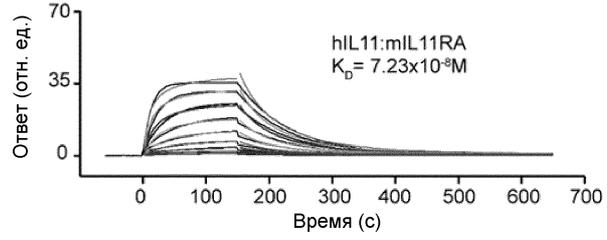


Фиг. 10G

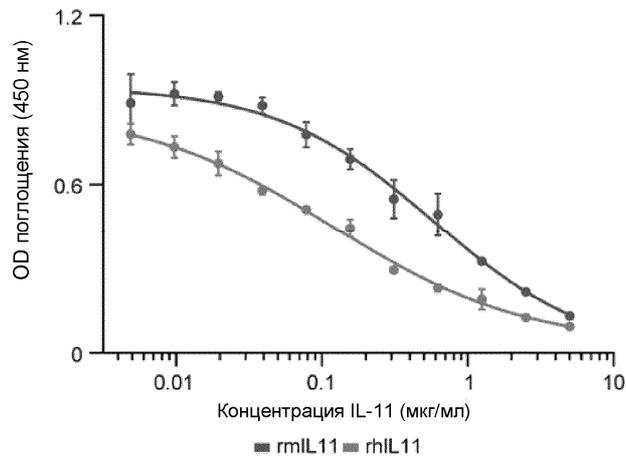
047713



Фиг. 10Н

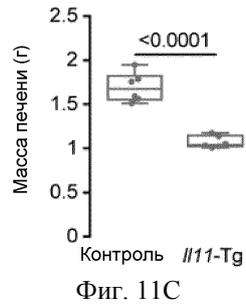
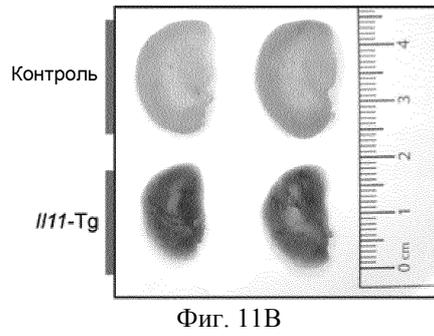
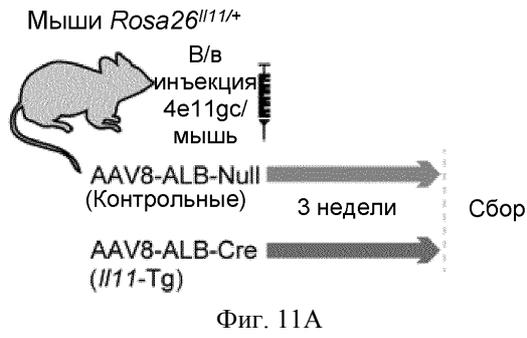
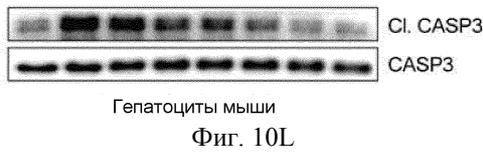
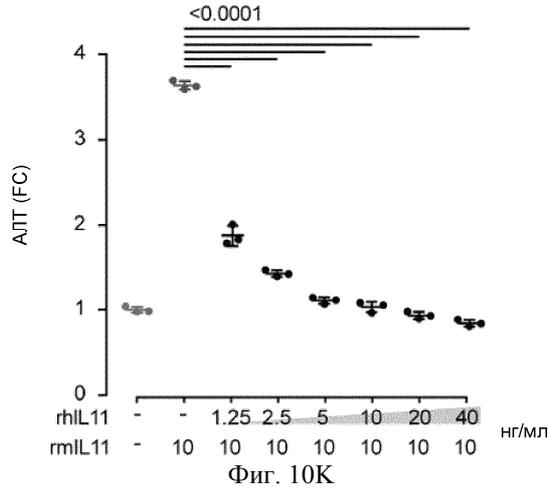


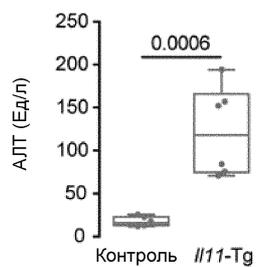
Фиг. 10I



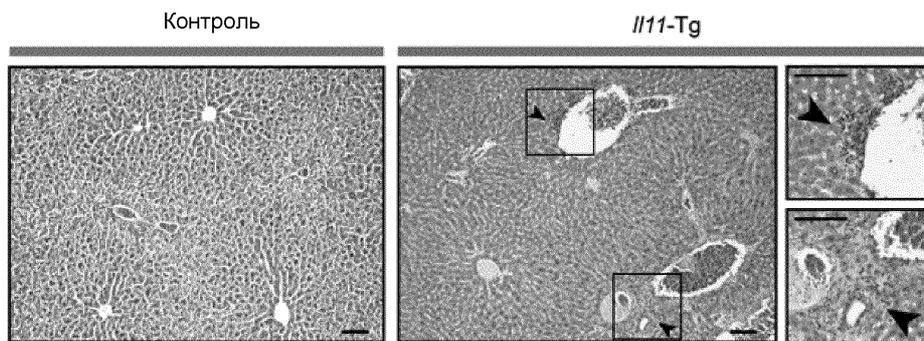
Фиг. 10J

047713

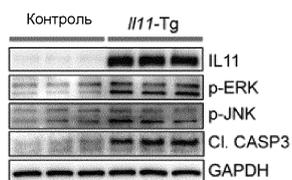




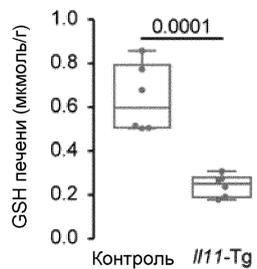
Фиг. 11D



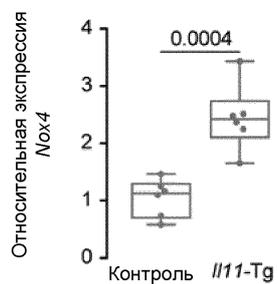
Фиг. 11E



Фиг. 11F

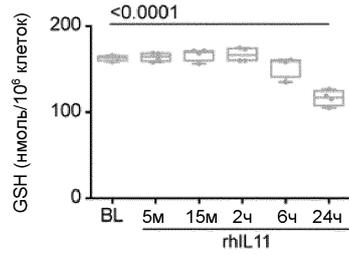


Фиг. 11G

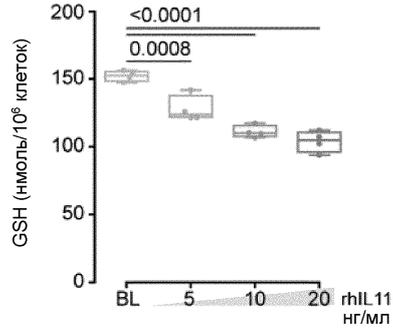


Фиг. 11H

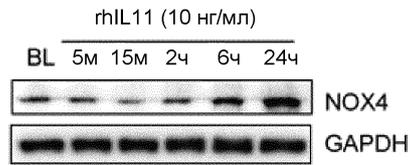
047713



Фиг. 11I



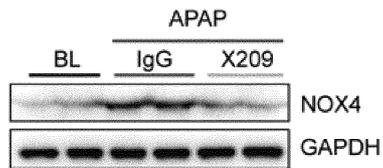
Фиг. 11J



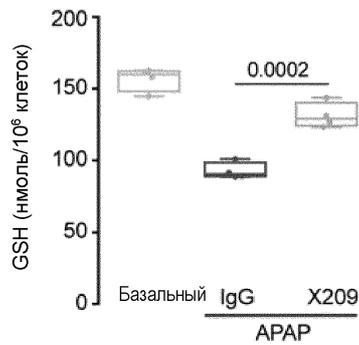
Фиг. 11K



Фиг. 11L

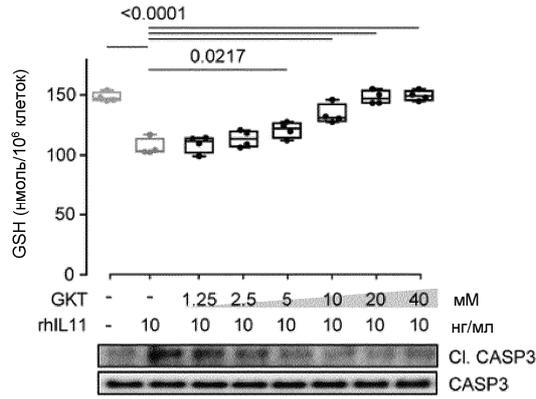


Фиг. 11M

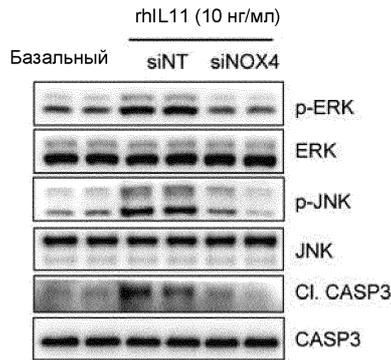


Фиг. 11N

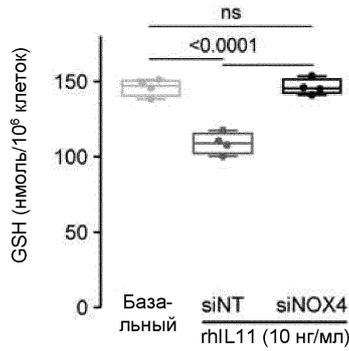
047713



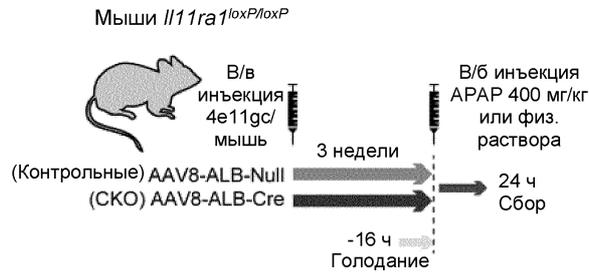
Фиг. 11O



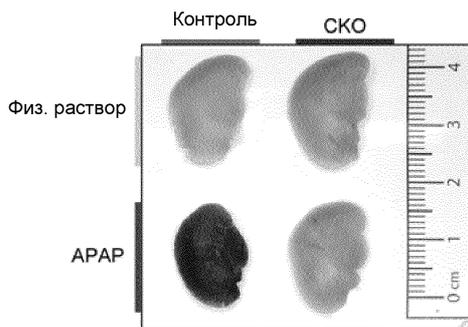
Фиг. 11P



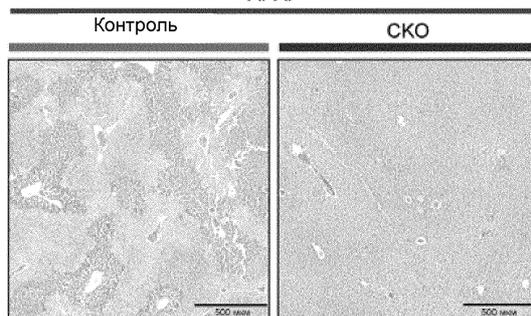
Фиг. 11Q



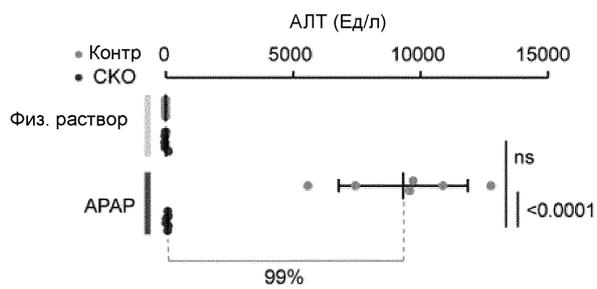
Фиг. 12A



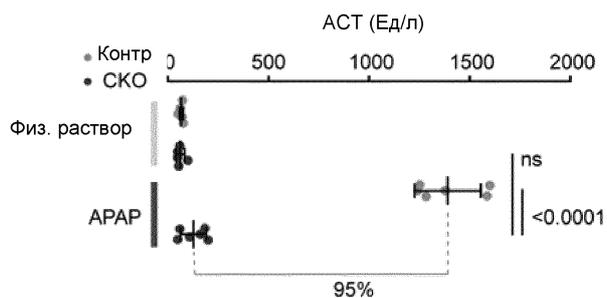
Фиг. 12В



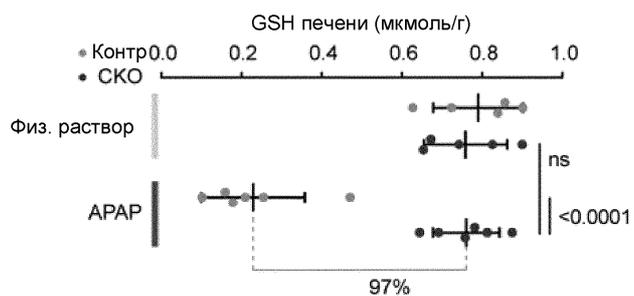
Фиг. 12С



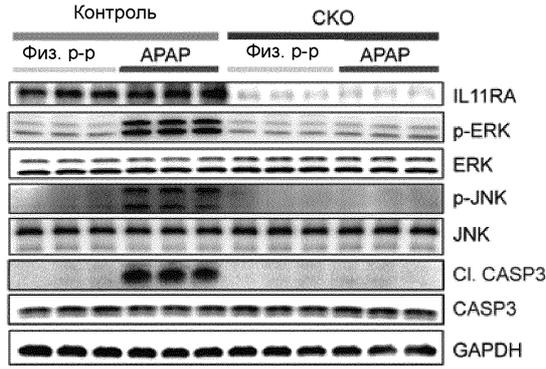
Фиг. 12D



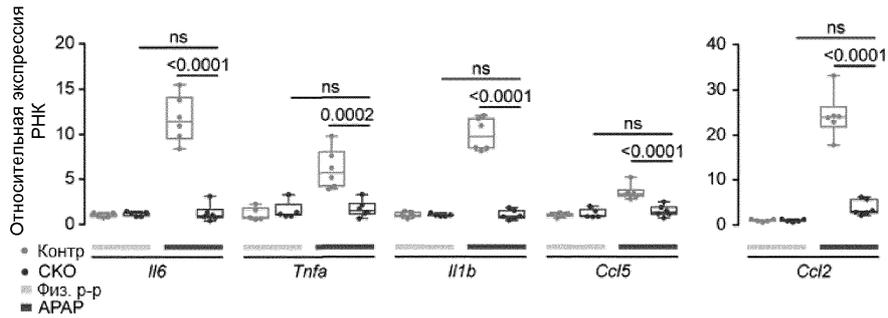
Фиг. 12Е



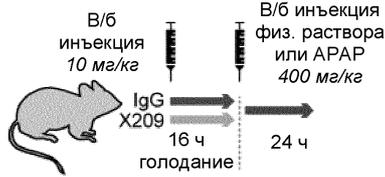
Фиг. 12F



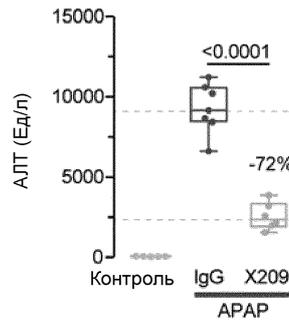
Фиг. 12G



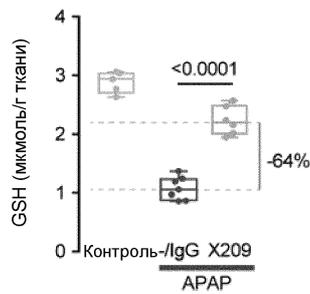
Фиг. 12H



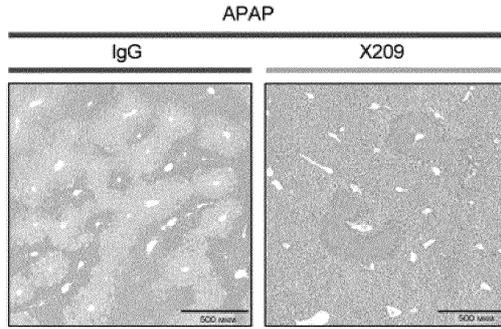
Фиг. 13A



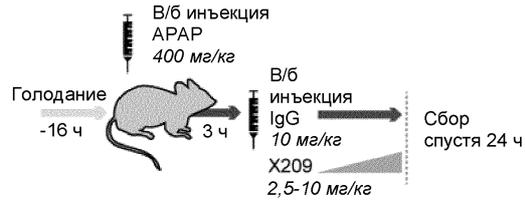
Фиг. 13B



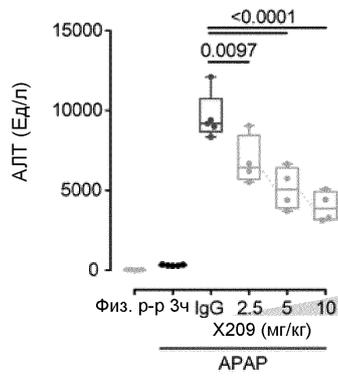
Фиг. 13C



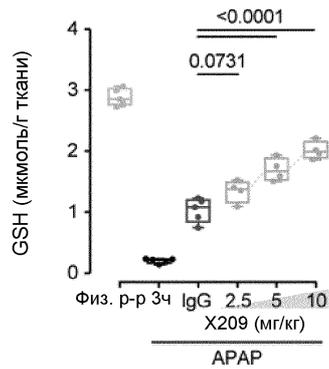
Фиг. 13D



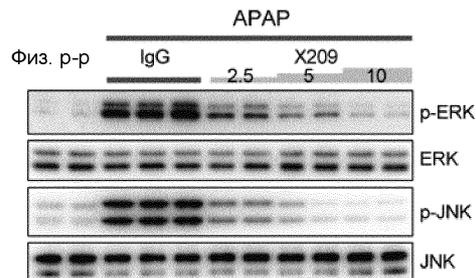
Фиг. 13Е



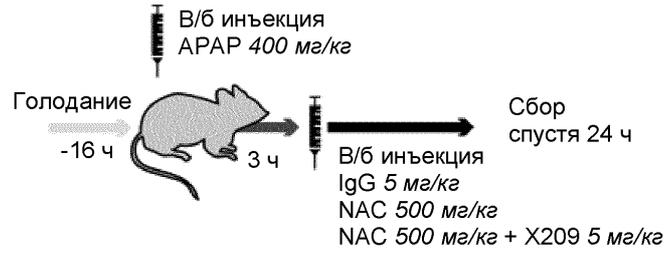
Фиг. 13F



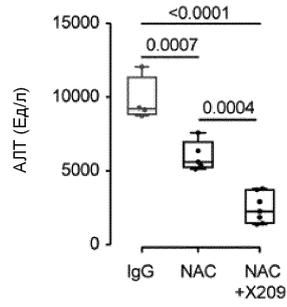
Фиг. 13G



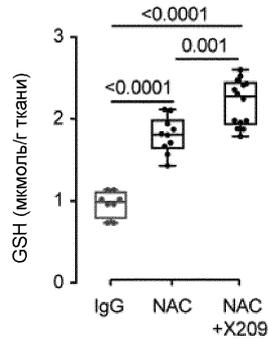
Фиг. 13H



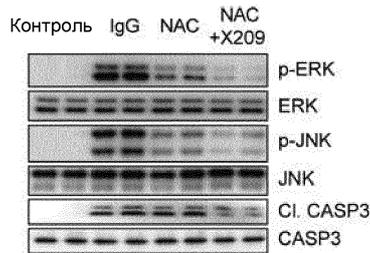
Фиг. 13I



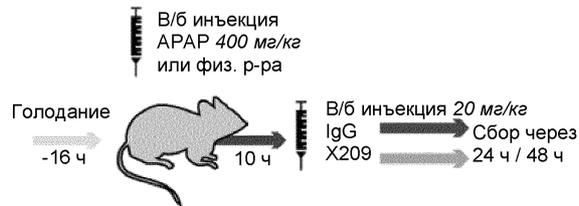
Фиг. 13J



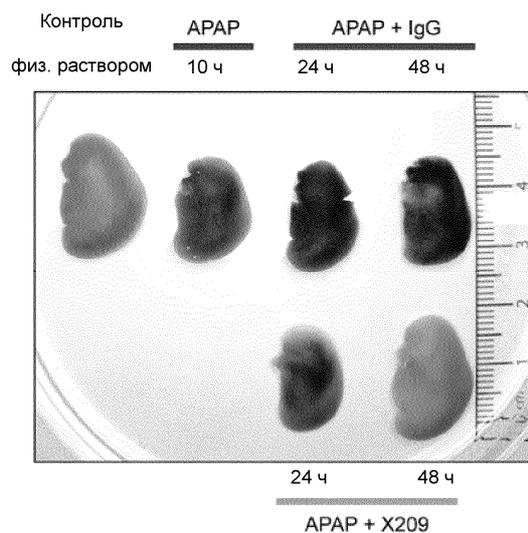
Фиг. 13K



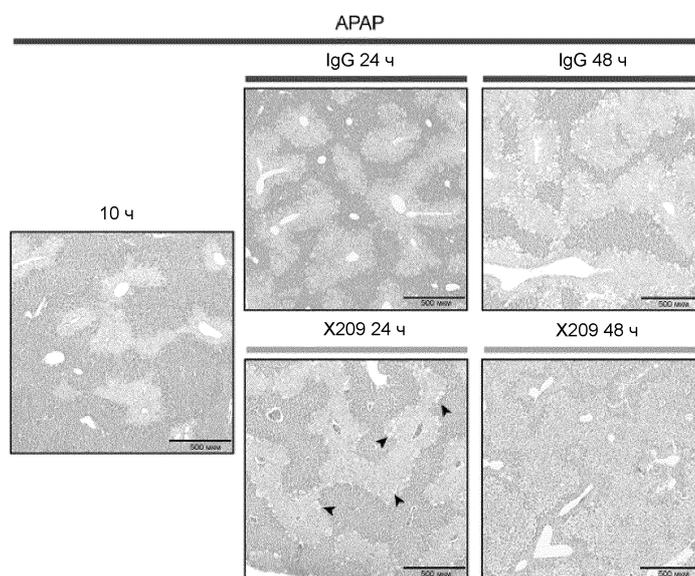
Фиг. 13L



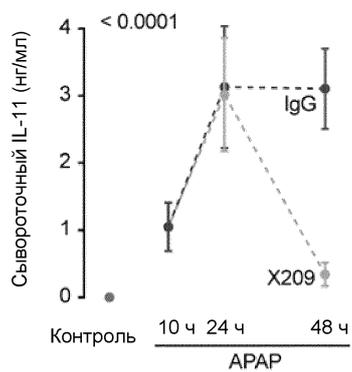
Фиг. 14А



Фиг. 14В

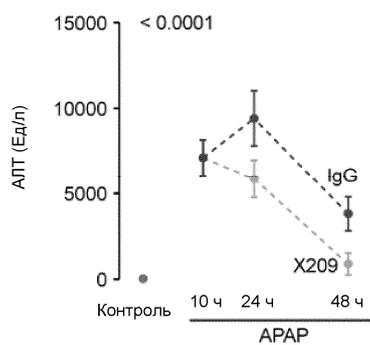


Фиг. 14С

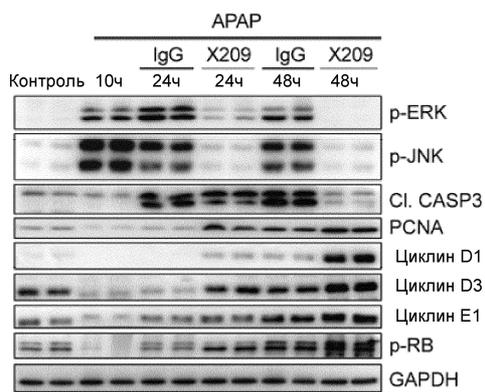


Фиг. 14D

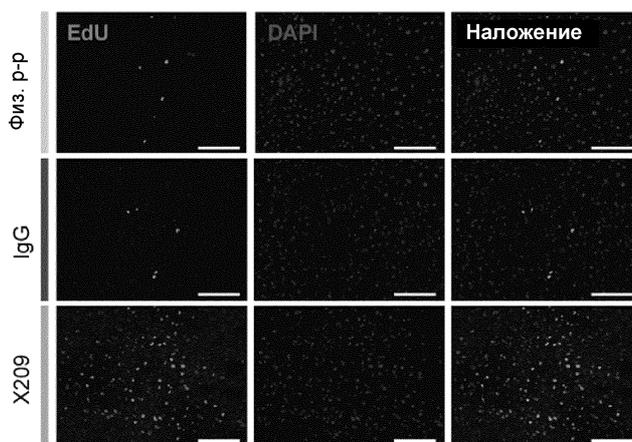
047713



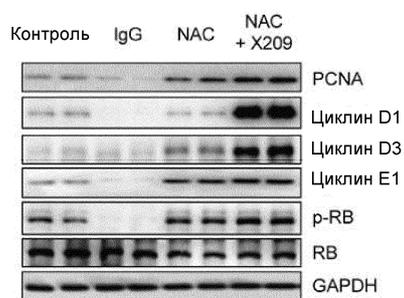
Фиг. 14Е



Фиг. 14F



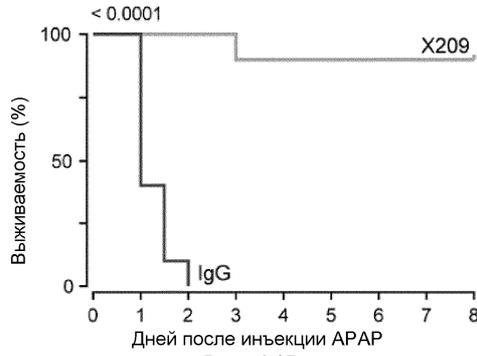
Фиг. 14G



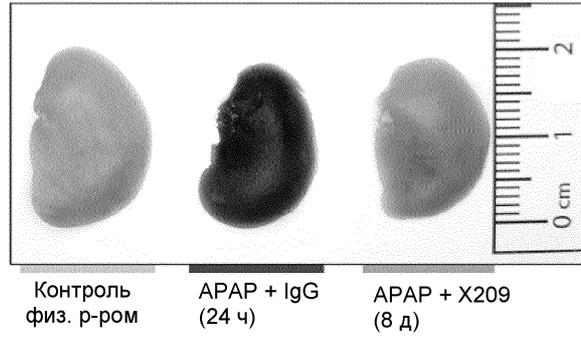
Фиг. 14H



Фиг. 14I

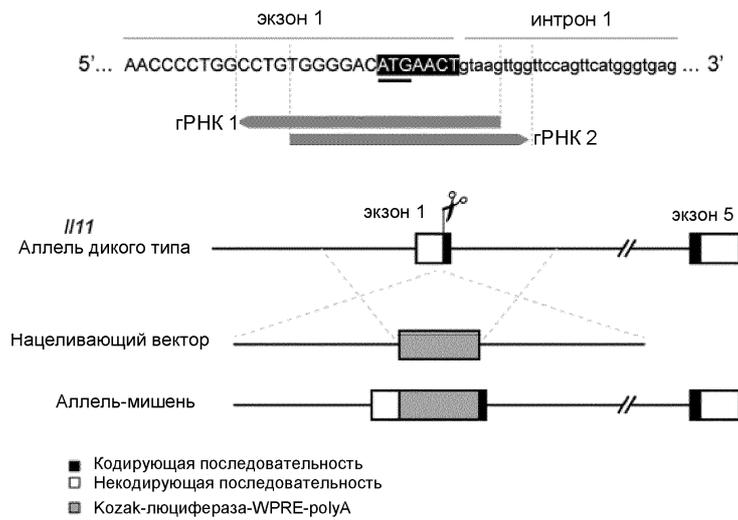


Фиг. 14J

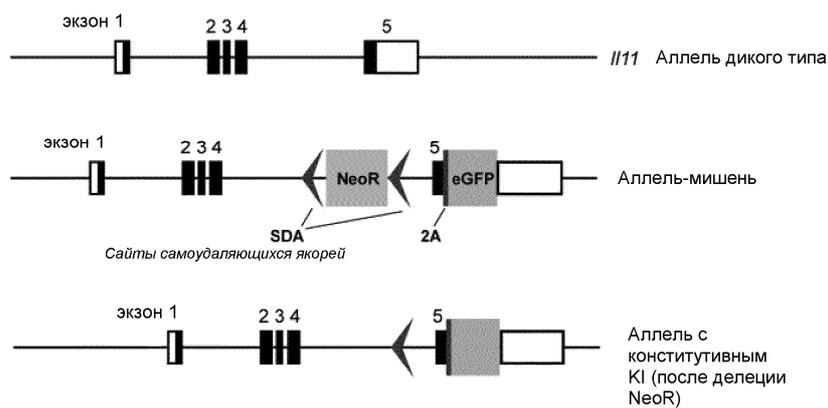


Фиг. 14K

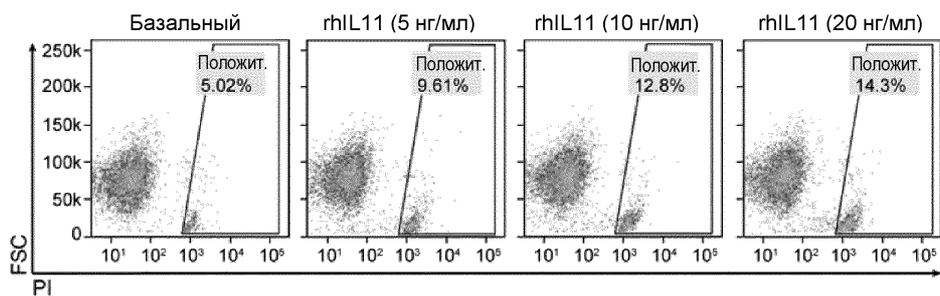
Подробные сведения о локусе с нокином



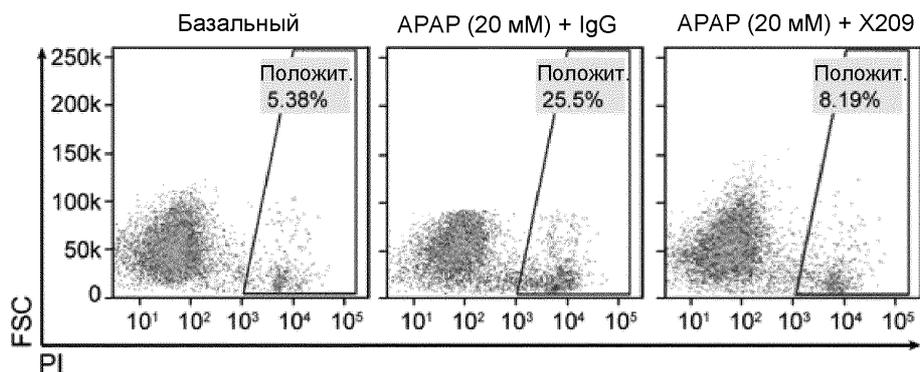
Фиг. 15



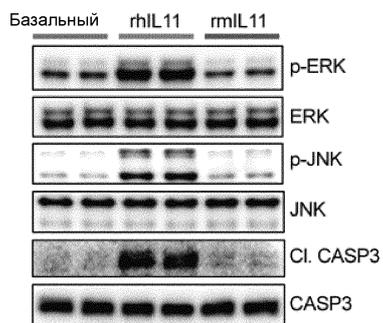
Фиг. 16



Фиг. 17А



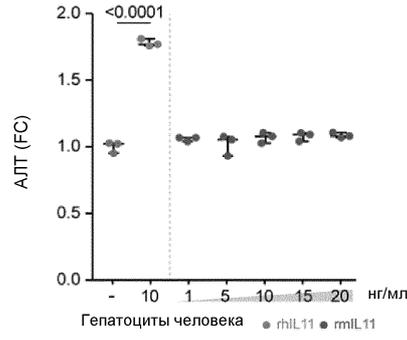
Фиг. 17В



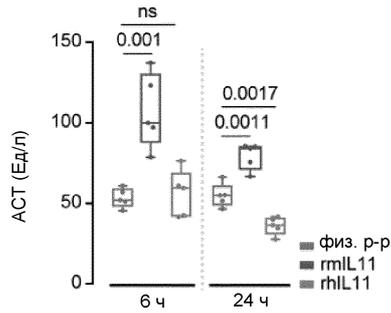
Гепатоциты человека

Фиг. 18А

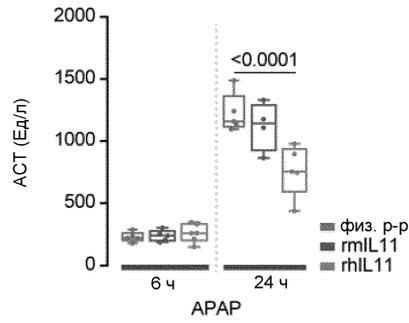
047713



Фиг. 18В



Фиг. 18С

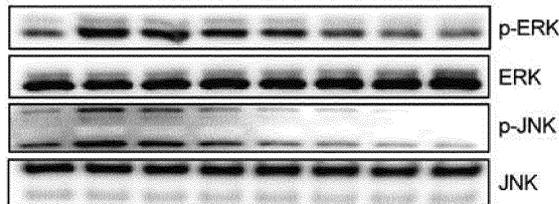


Фиг. 18D

лиганд	аналит	$K_d$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_a$ ( $s^{-1}$ )	$K_d$ (M)
hIL11	miL11RA	$1.66 \times 10^5$	$1.20 \times 10^{-2}$	$7.23 \times 10^{-8}$
miL11	miL11RA	$1.22 \times 10^5$	$1.15 \times 10^{-2}$	$9.41 \times 10^{-8}$
hIL11	hIL11RA	$4.51 \times 10^5$	$2.04 \times 10^{-2}$	$4.53 \times 10^{-8}$

Фиг. 18Е

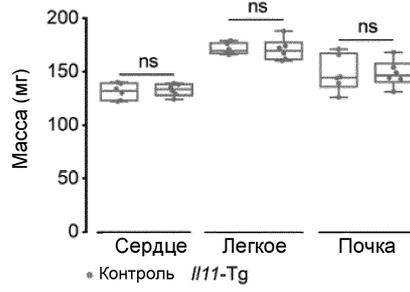
miL11 - 10 10 10 10 10 10 10 нг/мл  
rhIL11 - 1.25 2.5 5 10 20 40



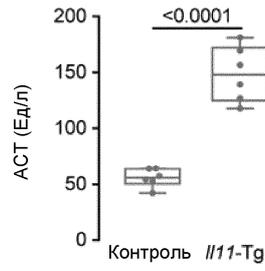
Гепатоциты мыши

Фиг. 18F

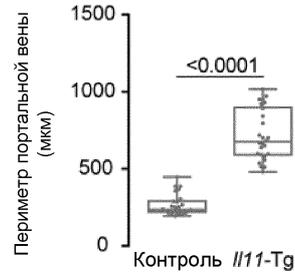
047713



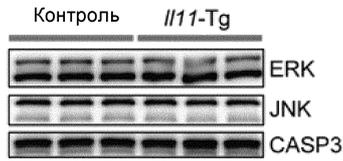
Фиг. 19А



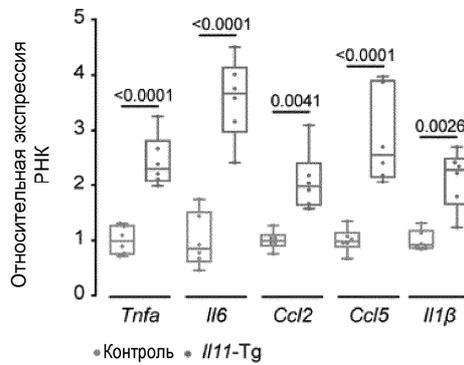
Фиг. 19В



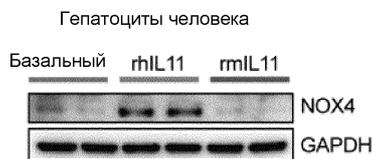
Фиг. 19С



Фиг. 19D

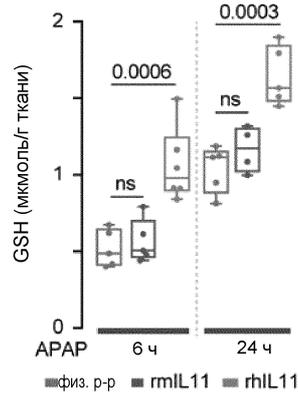


Фиг. 19Е



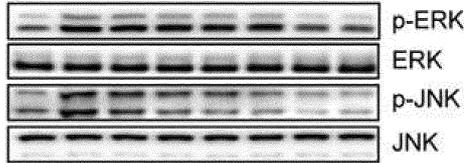
Фиг. 20А





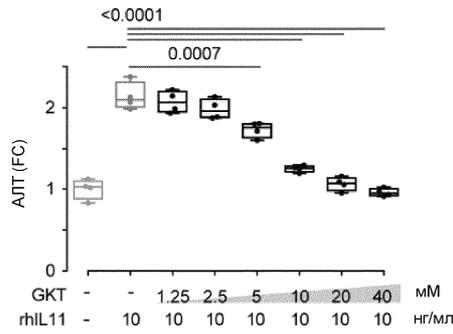
Фиг. 21В

rhIL11 - 10 10 10 10 10 10 10 нг/мл  
 GKT - - 1.25 2.5 5 10 20 40 мМ

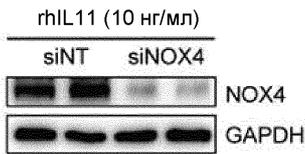


Гепатоциты человека

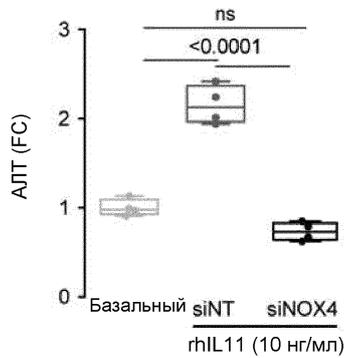
Фиг. 22А



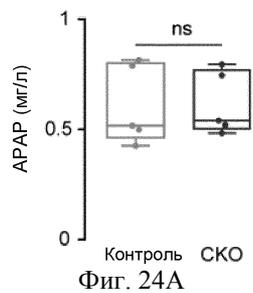
Фиг. 22В



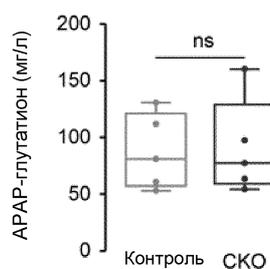
Фиг. 23А



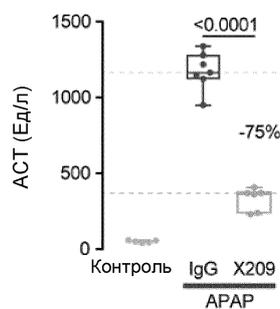
Фиг. 23В



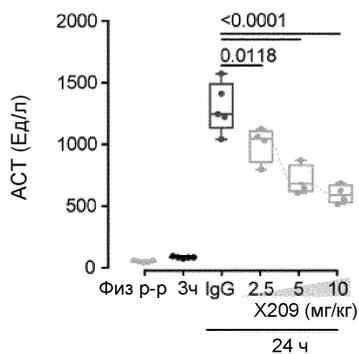
Фиг. 24А



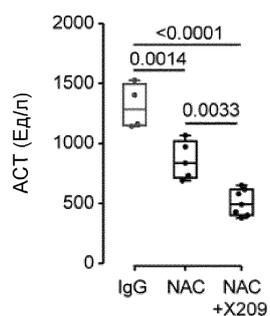
Фиг. 24В



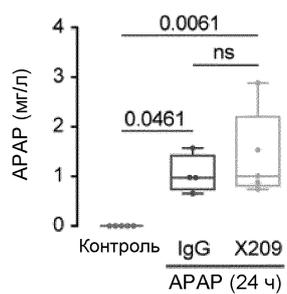
Фиг. 25А



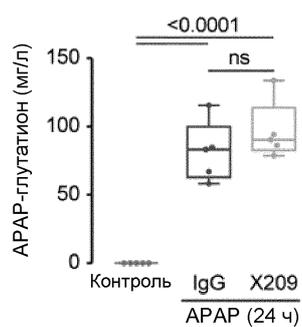
Фиг. 25В



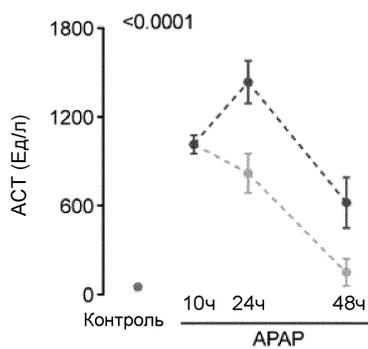
Фиг. 25С



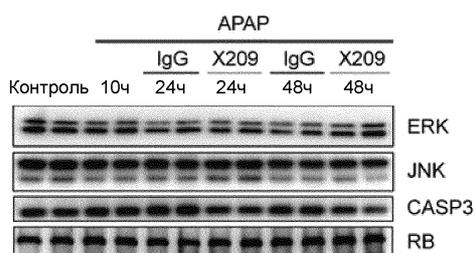
Фиг. 26А



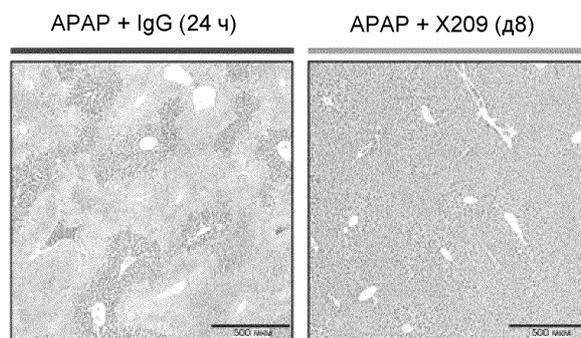
Фиг. 26В



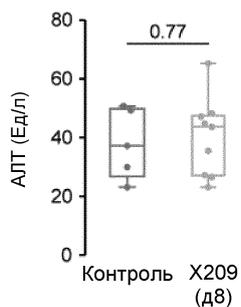
Фиг. 27А



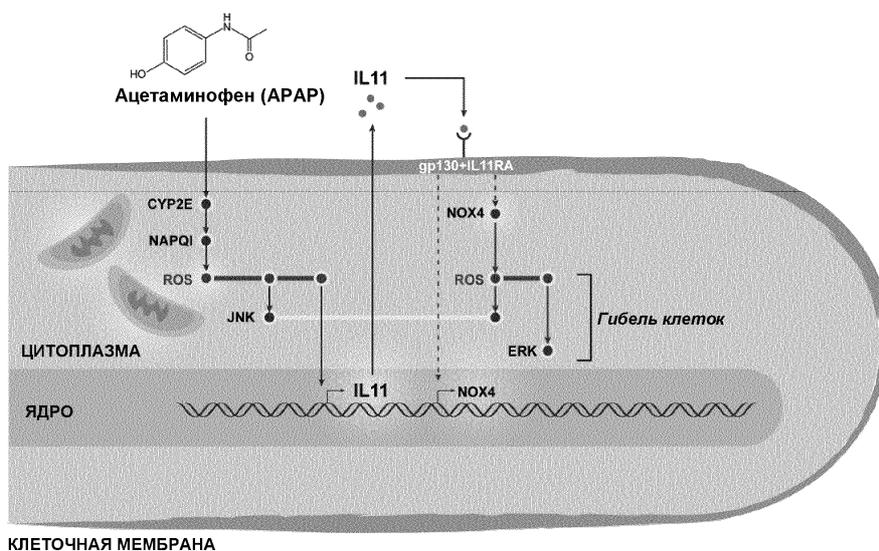
Фиг. 27В



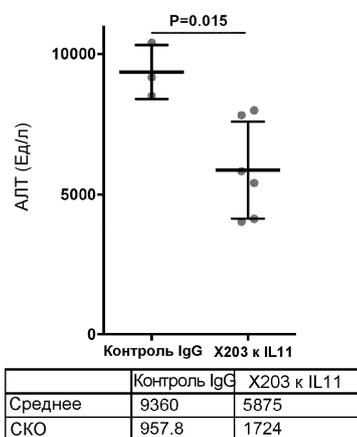
Фиг. 28А



Фиг. 28В

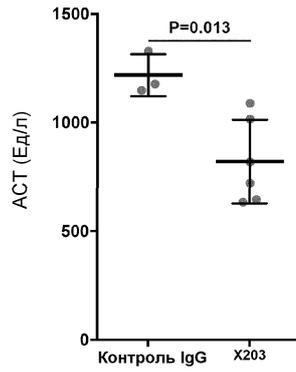


Фиг. 29



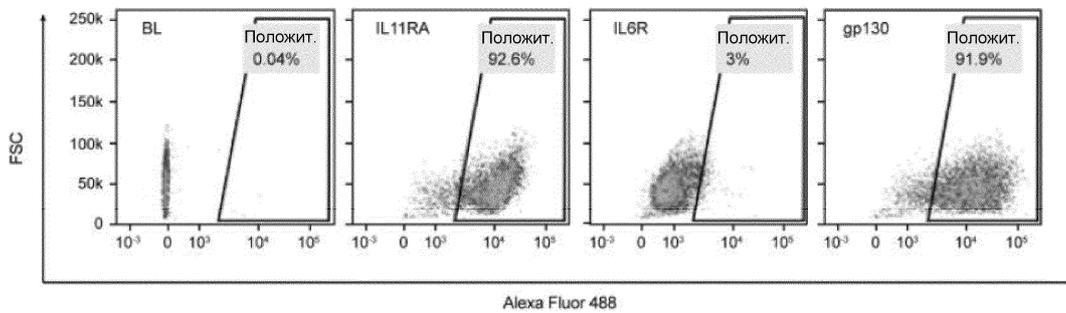
Фиг. 30А

047713

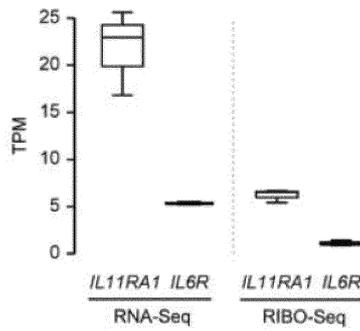


	Контроль IgG	X203
Среднее	1218	820.3
СКО	96.6	192.5

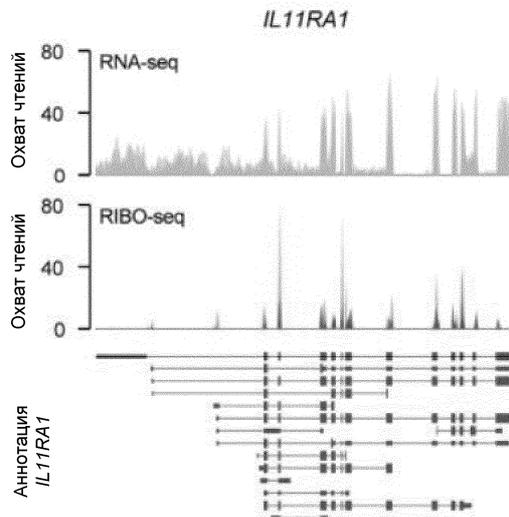
Фиг. 30В



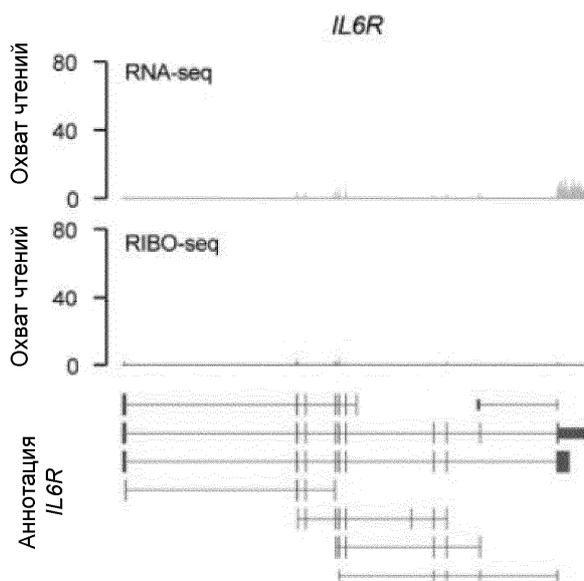
Фиг. 31А



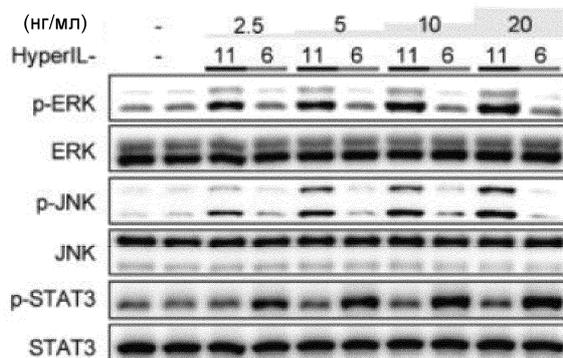
Фиг. 31В



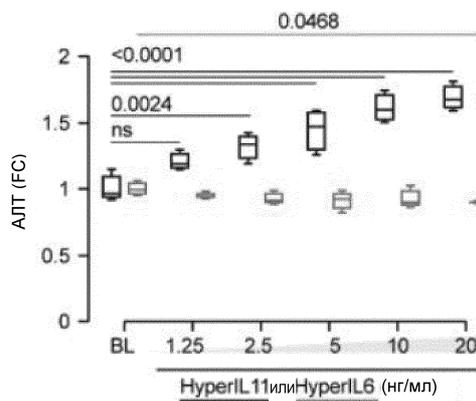
Фиг. 31С



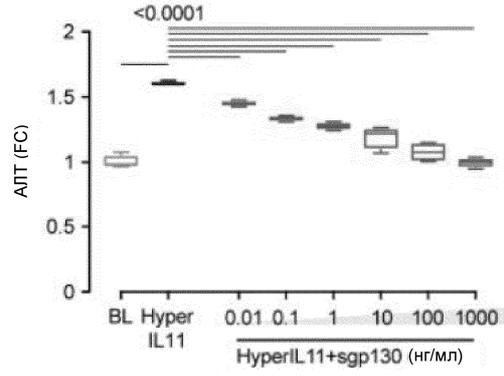
Фиг. 31D



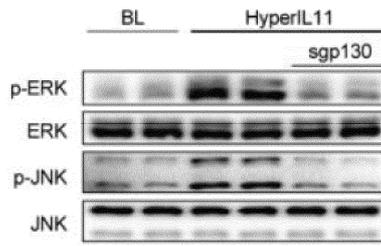
Фиг. 31E



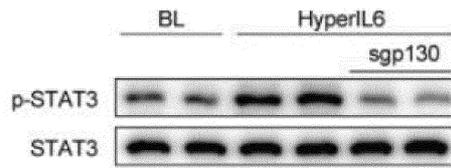
Фиг. 31F



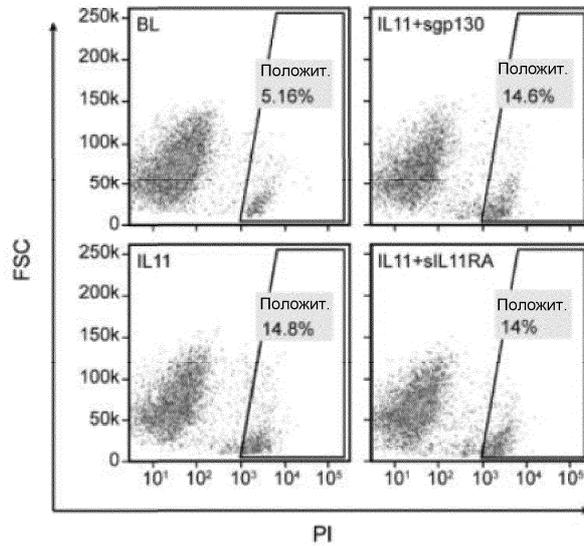
Фиг. 31Г



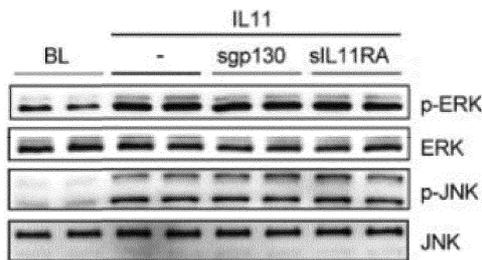
Фиг. 31Н



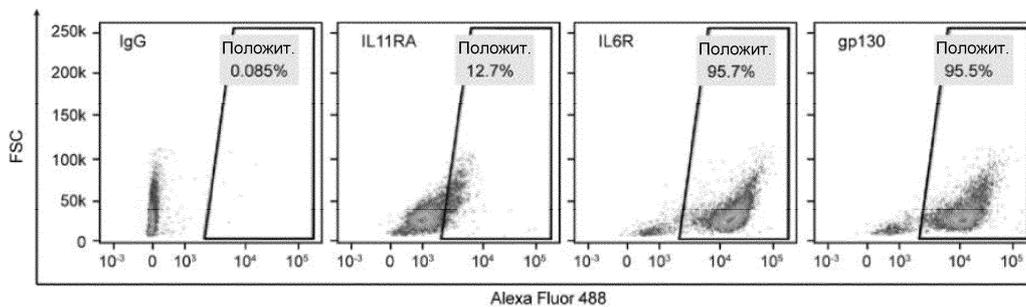
Фиг. 31И



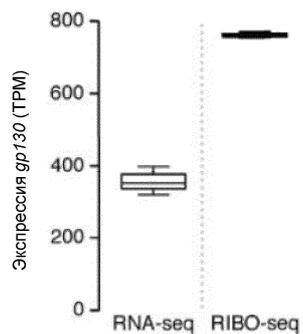
Фиг. 31J



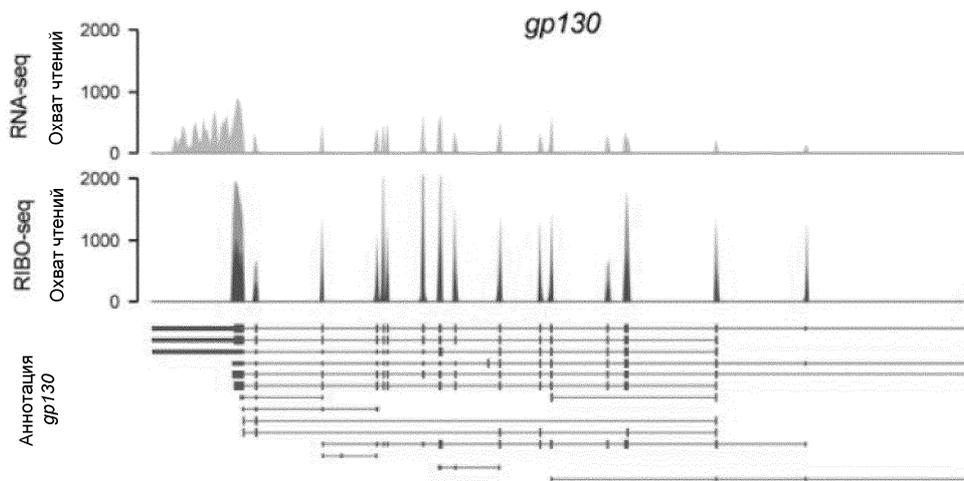
Фиг. 31К



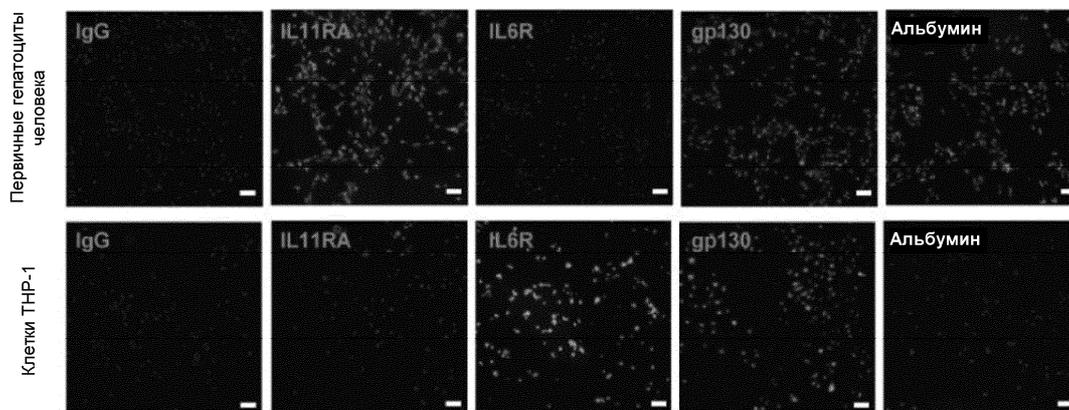
Фиг. 32А



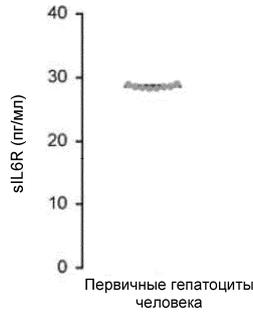
Фиг. 32В



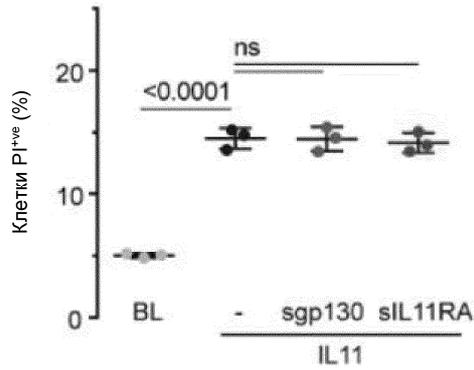
Фиг. 32С



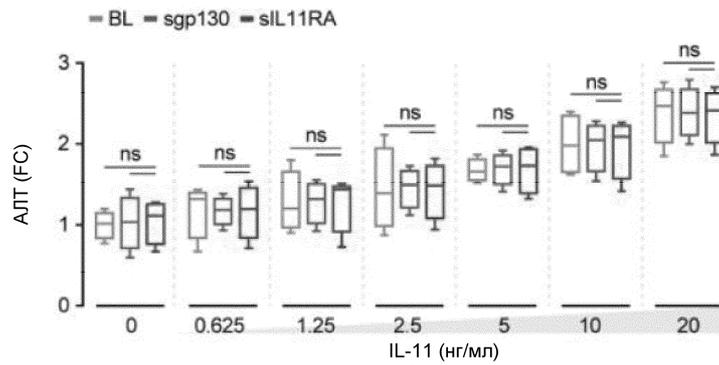
Фиг. 32D



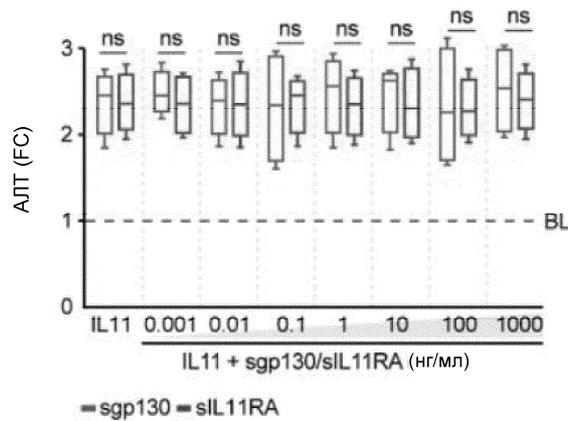
Фиг. 32Е



Фиг. 32F



Фиг. 32G



Фиг. 32H

