

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048010**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.21

(21) Номер заявки
202092668

(22) Дата подачи заявки
2019.06.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ИЛ-11

(31) 1809699.0

(32) 2018.06.13

(33) GB

(43) 2021.05.18

(86) PCT/EP2019/065598

(87) WO 2019/238882 2019.12.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СИНГАПУР ХЭЛС СЕРВИСЕС ПТЕ.
ЛТД.; НЭШНЛ ЮНИВЕРСИТИ
ОФ СИНГАПУР (SG);
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Кук Стюарт Александр, Шефер
Себастиан (SG)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2017103108

Anonymous: "Human IL-11 Antibody; Monoclonal Mouse IgG2A Clone # 22626 Catalog Number: MAB218", R&D Systems, 2 July 2018 (2018-07-02), XP55598955, Retrieved from the Internet: URL:www. [retrieved on 2019-06-24], page 1
CHENG M. ET AL.: "Cross-reactivity of antibody against SARS-coronavirus nucleocapsid protein with IL-11", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 338, no. 3, 23 December 2005 (2005-12-23), pages 1654-1660, XP027218611, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2005.10.088 [retrieved on 2005-11-15], figure 3

RU-A-2016151730

RU-A-2016125115

YUTAKA DEGUCHI ET AL.: "Generation of and characterization of anti-IL-11 antibodies using newly established Il11-deficient mice", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 505, no. 2, 26 September 2018 (2018-09-26), pages 453-459, XP55625225, AMSTERDAM, NL ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.128, the whole document
WO-A2-2018109174

(57) Предложены антигенсвязывающие молекулы, способные к связыванию с ИЛ-11, и способы медицинского лечения и профилактики с применением указанных антигенсвязывающих молекул.

B1

048010

**048010
B1**

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке GB1809699.0, поданной 13 июня 2018 г., содержание и элементы которой включены в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

Область техники

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии, более конкретно - к технологии антител. Настоящее изобретение также относится к способам медицинского лечения и профилактики. В частности, предложены антигенсвязывающие молекулы, способные к связыванию с ИЛ-11.

Уровень техники

Передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, как было показано, стимулирует гематопоез, стимулирует активность остеокластов, стимулирует нейрогенез, ингибирует адипогенез, снижает экспрессию провоспалительных цитокинов, модулирует метаболизм внеклеточного матрикса (ВКМ) и опосредует контроль нормального роста эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта. Физиологическая роль интерлейкина 11 (ИЛ-11) остается не вполне ясной. Выяснено, что ИЛ-11 наиболее тесно сопряжена с активацией гемопоэтических клеток и продуцированием тромбоцитов, однако высказывались также предположения о ее провоспалительной, а также противовоспалительной, проангиогенной роли и важности для новообразований.

Краткое описание изобретения

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложена антигенсвязывающая молекула, necessarily выделенная, способная к связыванию с ИЛ-11, при этом она содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 36 или 37

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 39 или 40; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 41, 42 или 43

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 44, 45 или 46

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 80 или 81.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 36

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 39 и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 41

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 44

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 80.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 37

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 40; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 42

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 45

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 81.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 37

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 40 и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 43

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 46

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 80.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит:

(a)

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 36

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 39 и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 41

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 44

мере на 70%, предпочтительно либо на 75%, либо на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 229 или 230.

В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов.

Согласно настоящему изобретению также предложена антигенсвязывающая молекула, необязательно выделенная, содержащая (i) антигенсвязывающую молекулу, описанную в настоящем документе, и (ii) антигенсвязывающую молекулу, способную к связыванию с антигеном, который не является ИЛ-11.

В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11, и рецептором ИЛ-11.

Согласно настоящему изобретению также предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, описанную в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению также предложена нуклеиновая кислота или совокупность нуклеиновых кислот необязательно выделенная, кодирующая антигенсвязывающую молекулу, описанную в настоящем документе или CAR, описанный в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению также предложен экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов, содержащий (содержащая) нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот, описанную в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению также предложена клетка, содержащая антигенсвязывающую молекулу, CAR, нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот, или экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов, описанные в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, или экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов, описанные в настоящем документе, в условиях, подходящих для экспрессии антигенсвязывающей молекулы или CAR с указанных нуклеиновой кислоты (кислот) или экспрессионного вектора (векторов).

Согласно настоящему изобретению также предложена композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу, CAR, нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот, экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов и/или клетку согласно настоящему описанию.

Согласно настоящему изобретению также предложены антигенсвязывающая молекула, CAR, нуклеиновая кислота или совокупность нуклеиновых кислот, экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов, клетка или композиция, описанные в настоящем документе, для применения в способе медицинского лечения или профилактики.

Согласно настоящему изобретению также предложены антигенсвязывающая молекула, CAR, нуклеиновая кислота или совокупность нуклеиновых кислот, экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов, клетка или композиция, описанные в настоящем документе, для применения в способе лечения или предотвращения фиброза, заболевания, характеризующегося фиброзом, рака, воспаления или заболевания, характеризующегося воспалением.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антигенсвязывающей молекулы, CAR, нуклеиновой кислоты или совокупности нуклеиновых кислот, экспрессионного вектора или совокупности экспрессионных векторов, клетки или композиции, описанных в настоящем документе, для получения лекарственного средства для применения в способе лечения или предотвращения фиброза, заболевания, характеризующегося фиброзом, рака, воспаления или заболевания, характеризующегося воспалением.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения или предотвращения фиброза, заболевания, характеризующегося фиброзом, рака, воспаления или заболевания, характеризующегося воспалением, включающий введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества антигенсвязывающей молекулы, CAR, нуклеиновой кислоты или совокупности нуклеиновых кислот, экспрессионного вектора или совокупности экспрессионных векторов, клетки или композиции, описанных в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ ингибирования опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов, включающий приведение экспрессирующих ИЛ-11 клеток в контакт с антигенсвязывающей молекулой, описанной в настоящем документе. Указанный способ может быть реализован *in vitro*, *in vivo*, *in situ* или *ex vivo*.

Согласно настоящему изобретению также предложен *in vitro* комплекс, необязательно выделенный, содержащий антигенсвязывающую молекулу, описанную в настоящем документе, связанную с ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ, включающий приведение образца, содержащего или предположительно содержащего ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, в контакт с антигенсвязывающей молекулой, описанной в настоящем документе, и обнаружение образования комплекса антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ выбора или стратификации субъекта для лечения направленным на ИЛ-11 агентом, который включает приведение *in vitro* образца от указанного субъекта в контакт с антигенсвязывающей молекулой, описанной в настоящем документе, и обнаружение образования комплекса антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антигенсвязывающей молекулы, описанной в настоящем документе, в качестве *in vitro* или *in vivo* диагностического или прогностического агента.

Согласно настоящему изобретению также предложен набор из частей, содержащий заранее заданное количество: антигенсвязывающей молекулы, CAR, нуклеиновой кислоты или совокупности нуклеиновых кислот, экспрессионного вектора или совокупности экспрессионных векторов, клетки или композиции, описанных в настоящем документе.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым связывающим ИЛ-11 молекулам с улучшенными свойствами по сравнению с известными антителами против ИЛ-11. Согласно настоящему изобретению предложены связывающие ИЛ-11 молекулы с комбинациями требуемых биофизических и функциональных свойств, отличающиеся от связывающих ИЛ-11 антигенсвязывающих молекул, известных из предшествующего уровня техники.

Интерлейкин 11 и рецепторы ИЛ-11

Интерлейкин 11 (ИЛ-11), также известный как фактор ингибирования адипогенеза, представляет собой плеiotропный цитокин и представитель семейства цитокинов ИЛ-6, которое включает ИЛ-6, ИЛ-11, ИЛ-27, ИЛ-31, онкостатин, фактор ингибирования лейкоза (LIF), кардиотрофин-1 (СТ-1), кардиотрофино-подобный цитокин (CLC), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) и нейропозтин (NP-1).

Интерлейкин 11 (ИЛ-11) экспрессируется в мезенхимальных клетках различных типов. Геномные последовательности ИЛ-11 были картированы на хромосому 19 и центромерную область хромосомы 71, и он транскрибируется с каноническим сигнальным пептидом, обеспечивающим эффективную секрецию клетками. Комплекс белка-активатора ИЛ-11, cJun/AP-1, локализованный в его промоторной последовательности, критически важен для базальной транскрипционной регуляции ИЛ-11 (Du and Williams., Blood 1997, Vol. 89: 3897-3908). Незрелая форма ИЛ-11 человека представляет собой полипептид размером 199 аминокислот, тогда как зрелая форма ИЛ-11 кодирует белок из 178 остатков аминокислот (Gargers and Scheller., Biol. Chem. 2013; 394(9): 1145-1161). Последовательность аминокислот ИЛ-11 человека доступна в UniProt под номером доступа P20809 (P20809.1 GI:124294; SEQ ID NO: 1). Также коммерчески доступен рекомбинантный ИЛ-11 человека (опрелвекин). Также были клонированы и секвенированы ИЛ-11 других видов, в том числе мыши, крысы, свиньи, коровы, нескольких видов костистых рыб и приматов.

В настоящем описании "ИЛ-11" относится к ИЛ-11 любого вида и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи ИЛ-11 любого вида. В настоящем документе "фрагмент", "вариант" или "гомолог" белка необязательно может быть охарактеризован как отличающийся по меньшей мере 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот референсного белка. Согласно некоторым вариантам реализации фрагменты, варианты, изоформы и гомологи референсного белка могут быть охарактеризованы по способности выполнять функцию, выполняемую указанным референсным белком.

"Фрагмент" обычно относится к части референсного белка. "Вариант" обычно относится к белку, имеющему последовательность аминокислот, содержащую одну или более замен аминокислот, инсерций, делеций или других модификаций относительно последовательности аминокислот референсного белка, однако сохраняющему значительную степень (например, по меньшей мере 60%) идентичности последовательностей последовательности аминокислот референсного белка. "Изоформа" обычно относится к варианту референсного белка, экспрессируемому тем же видом, который экспрессирует референсный белок. "Гомолог" обычно относится к варианту референсного белка, продуцируемому не тем видом, который продуцирует референсный белок. Гомологи включают ортологи. "Фрагмент" может иметь любую длину (по числу аминокислот), хотя может необязательно иметь длину, составляющую по меньшей мере 20% от длины референсного белка (то есть белка, из которого получен указанный фрагмент), и может иметь максимальную длину, составляющую 50%, либо 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от длины референсного белка. Минимальная длина фрагмента ИЛ-11 может составлять 10 аминокислот, а максимальная длина - 15, либо 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 195 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный ИЛ-11 представляет собой ИЛ-11 млекопитающего (например, примата (макак-резус, яванского макака, не являющегося человеком примата или человека) и/или грызуна (например, крысы или мыши) ИЛ-11). Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи ИЛ-11 могут необязательно характеризоваться последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 70%, предпочтительно либо на 80%, либо на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности аминокислот изоформы незрелого или зрелого ИЛ-

11 от определенного вида, например человека. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-11 согласно настоящему описанию содержит последовательность аминокислот или состоит из последовательности аминокислот, которая по меньшей мере 70%, предпочтительно либо на 80%, либо на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO:1.

Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи ИЛ-11 могут необязательно характеризоваться способностью связывать рецептор ИЛ-11 (например, ИЛ-11R α , gp130 и/или комплекс, содержащий ИЛ-11R α и gp130, предпочтительно от одного и того же вида) и стимулировать трансдукцию сигнала в клетках, экспрессирующих ИЛ-11R α и gp130 (например, согласно описанию в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11); или Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80).

ИЛ-11 передает сигнал через гомодимер универсально экспрессируемого гликопротеина 130 (gp130; также известен как гликопротеин 130, ИЛ-6ST, ИЛ-6-бета или CD130). Gp130 представляет собой трансмембранный белок, образующий одну субъединицу цитокинового рецептора типа I семейства рецепторов ИЛ-6. Специфичность достигается за счет индивидуальной субъединицы альфа рецептора интерлейкина 11 (ИЛ-11R α), которая прямо не участвует в трансдукции сигнала, хотя начальное событие связывания цитокина с α -рецептором приводит к образованию итогового комплекса с gp130.

gp130 человека (в том числе сигнальный пептид размером 22 аминокислоты) представляет собой белок размером 918 аминокислот; зрелая форма имеет размер 866 аминокислот, содержит внеклеточный домен размером 597 аминокислот, трансмембранный домен размером 22 аминокислоты и внутриклеточный домен размером 277 аминокислот. Указанный внеклеточный домен белка содержит цитокин-связывающий модуль (CBM) gp130. CBM gp130 содержит Ig-подобный домен D1 и фибронектиновые домены типа III D2 и D3 gp130. Последовательность аминокислот gp130 человека доступна под номером доступа в UniProt P40189-1 (SEQ ID NO:2).

ИЛ-11R α человека представляет собой полипептид размером 422 аминокислоты (UniProt Q14626; SEQ ID NO:3) и отличается ~85% идентичностью последовательностей нуклеотидов и аминокислот ИЛ-11R α мыши (Du and Williams., Blood Vol, 89, No, 11, June 1, 1997). Были описаны две изоформы ИЛ-11R α , которые отличаются цитоплазматическим доменом (Du and Williams, выше), α -цепь рецептора ИЛ-11a (ИЛ-11R α) сходна с α -цепью рецептора ИЛ-6 (IL-6R α) многими структурными и функциональными свойствами. Внеклеточный домен демонстрирует идентичность 24% аминокислот, в том числе характерного консервативного мотива Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). В коротком цитоплазматическом домене (34 аминокислоты) отсутствуют области Box 1 и 2, необходимые для активации пути передачи сигналов JAK/STAT.

Были картированы сайты связывания рецептора на ИЛ-11 мыши и идентифицировано три сайта - сайты I, II и III. Связывание с gp130 снижается при введении замен в область сайта II и замен в область сайта III. Мутанты по сайту III не проявляют детектируемой агонистической активности и характеризуются антагонистической относительно ИЛ-11R α активностью (источник: "Ингибиторы цитокинов" ("Cytokine Inhibitors"), глава 8; под редакцией Gennaro Ciliberto и Rocco Savino, Marcel Dekker, Inc. 2001).

В настоящем описании рецептор ИЛ-11/рецептор ИЛ-11 (ИЛ-11R) относится к полипептиду или полипептидному комплексу, способному к связыванию ИЛ-11, и/или комплекса, содержащего ИЛ-11. Согласно некоторым вариантам реализации рецептор ИЛ-11 способен к связыванию ИЛ-11 и/или комплексом, содержащим ИЛ-11, и индуцированию трансдукции сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор ИЛ-11. "Комплекс, содержащий ИЛ-11" может представлять собой нековалентный комплекс ИЛ-11 и полипептида, способного к нековалентному связыванию с ИЛ-11.

Рецептор ИЛ-11 может быть рецептором любого вида и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи рецептора ИЛ-11 любого вида. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанный вид представляет собой человека (*Homo sapiens*).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рецептор ИЛ-11 (ИЛ-11R) может представлять собой ИЛ-11R α . Согласно некоторым вариантам реализации рецептор для ИЛ-11 может представлять собой полипептидный комплекс, содержащий ИЛ-11R α . Согласно некоторым вариантам реализации указанный рецептор ИЛ-11 может представлять собой полипептидный комплекс, содержащий ИЛ-11R α и gp130. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рецептор ИЛ-11 может представлять собой gp130 или комплекс, содержащий gp130, с которым связывается ИЛ-11.

Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи ИЛ-11R α могут необязательно характеризоваться последовательностью аминокислот, по меньшей мере на 70%, предпочтительно либо на 80%, либо на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности аминокислот ИЛ-11R α определенного вида, например человека. Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи ИЛ-11R α могут необязательно характеризоваться способностью связывать ИЛ-11 (предпочтительно того же вида) и стимулировать трансдукцию сигнала в клетках, экспрессирующих ИЛ-11R α и gp130 (например, согласно описанию в источниках: Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) или Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80). Фрагмент рецептора ИЛ-11 может иметь любую длину (по количеству аминокислот), хотя необязательно может иметь длину, составляющую по меньшей мере 25% от

длины зрелого ИЛ-11R α и максимальную длину, составляющую 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от длины зрелого ИЛ-11R α . Фрагмент рецептора ИЛ-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 ИЛ-11

ИЛ-11 связывается с ИЛ-11R α с низкой аффинностью ($K_d \sim 10$ нмоль/л), и взаимодействие между указанными партнерами для связывания само по себе не является достаточным для трансдукции биологического сигнала. Получение высокоаффинного рецептора ($K_d \sim 400-800$ пмоль/л), способного к трансдукции сигнала, требует коэкспрессии ИЛ-11R α и gp130 (Curtis et al (Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12; Hilton et al., EMBO J 13:4765, 1994; Nandurkar et al., Oncogene 12:585, 1996). Связывание ИЛ-11 с ИЛ-11R α клеточной поверхности индуцирует гетеродимеризацию, фосфорилирование тирозина, активацию gp130 и последующую передачу сигналов, в основном через каскад митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и путь Янус-киназы/переносчика сигнала и активатора транскрипции (Jak/STAT) (Garbers and Scheller, выше).

В принципе, растворимый ИЛ-11R α может также формировать биологически активные растворимые комплексы с ИЛ-11 (Pflanz et al., 1999 FEBS Lett, 450, 117-122), таким образом, возможно, ИЛ-11 способен, аналогично ИЛ-6, в некоторых случаях связывать растворимый ИЛ-11R α до связывания gp130 клеточной поверхности (Garbers and Scheller, выше). Curtis с соавторами (Curtis et al, Blood 1997 Dec 1;90(11):4403-12) описали экспрессию цепи растворимого рецептора альфа ИЛ-11 мыши (sIL-11R) и исследовали передачу сигналов в клетках, экспрессирующих gp130. В присутствии gp130, но не трансмембранного ИЛ-11R, опосредованная sIL-11R ИЛ-11-зависимая дифференцировка клеток лейкоза M1 и пролиферация у клеток Ba/F3, а также ранние внутриклеточные события, в том числе фосфорилирование gp130, STAT3 и SHP2, аналогичны передаче сигналов через трансмембранный ИЛ-11R. Недавно была продемонстрирована активация передачи сигналов через связанный с мембраной клеток gp130 под действием ИЛ-11, связанного с растворимым ИЛ-11R α (Lokau et al., 2016 Cell Reports 14, 1761-1773). Указанная так называемая транс-передача сигналов ИЛ-11 может представлять собой очень важный компонент опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов, и может даже быть наиболее распространенной формой опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов, поскольку экспрессия ИЛ-11R α ограничена относительно маленькой подгруппой типов клеток, тогда как gp130 экспрессируется в широком диапазоне типов клеток.

В настоящем документе "передача сигналов ИЛ-11" и "опосредованная ИЛ-11 передача сигналов" относится к передаче сигналов, опосредованной связыванием ИЛ-11, его фрагмента, обладающего функцией молекулы зрелого ИЛ-11, или комплекса, содержащего ИЛ-11/его фрагмента, обладающего функцией молекулы зрелого ИЛ-11, с рецептором ИЛ-11.

В настоящем документе "транс-передача сигналов ИЛ-11" относится к передаче сигналов, которую запускает связывание ИЛ-11, связанного с ИЛ-11R α , с gp130. ИЛ-11 может быть связан с ИЛ-11R α в нековалентном комплексе. gp130 связан с мембраной и экспрессируется клеткой, где происходит передача сигналов после связывания комплекса ИЛ-11:ИЛ-11R α с gp130. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ИЛ-11R α может представлять собой растворимый ИЛ-11R α . Согласно некоторым вариантам реализации указанный растворимый ИЛ-11R α представляет собой растворимую (секретируемую) изоформу ИЛ-11R α (например, с отсутствием трансмембранного домена). Согласно некоторым вариантам реализации указанный растворимый ИЛ-11R α представляет собой высвобождаемый продукт протеолитического расщепления внеклеточного домена связанного с мембраной клеток ИЛ-11R α . Согласно некоторым вариантам реализации указанный ИЛ-11R α может быть связан с мембраной клетки, и передачу сигналов через gp130 может запускать связывание ИЛ-11, связанного со связанным с мембраной клеток ИЛ-11R α , называемое "цис-передача сигналов ИЛ-11".

Передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, как было показано, стимулирует гематопоз и тромбоцитоз, стимулирует активность остеокластов, стимулирует нейрогенез, ингибирует адипогенез, снижает экспрессию провоспалительных цитокинов, модулирует метаболизм внеклеточного матрикса (ВКМ) и опосредует контроль нормального роста эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта (Du and Williams, выше).

Физиологическая роль интерлейкина 11 (ИЛ-11) остается неясной. Для ИЛ-11 была установлена наиболее сильная связь с активацией гемопоэтических клеток и с продуцированием тромбоцитов, однако также предполагалась его провоспалительная, а также противовоспалительная, проангиогенная роль и важность для новообразований. Известно, что трансформирующий ростовой фактор $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$) или повреждение тканей могут индуцировать экспрессию ИЛ-11 (Zhu, M. et al. PLOS ONE 10, (2015); Yashiro, R. et al. J. Clin. Periodontol. 33, 165-71 (2006); Obana, M. et al. Circulation 121, 684-91 (2010); Tang, W et al. J. Biol. Chem. 273, 5506-13 (1998)).

ИЛ-11 представляет собой важный посттранскрипционный модулятор опосредованной ТФР- β передачи сигналов. ТФР- $\beta 1$, как было показано, стимулирует область промотора AP-1 ИЛ-11, а индуци-

руемая ТФР- β секреция ИЛ-11, как было показано, индуцирует активацию MAP-киназ ERK p42/44 и p38 в миофибробласты кишечника (Bamba et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. (2003)(285(3):G529-38). Ингибиторы MAP-киназ способны значимо снижать индуцированную ТФР- β секрецию ИЛ-11, а опосредованная MAP-киназой p38 стабилизация мРНК, как было показано, критически важна для индуцируемой ТФР- β секреции ИЛ-11.

Недавно было продемонстрировано, что передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, играет ключевую роль в фибротических процессах в широком спектре тканей; см. например, источники: WO 2017/103108 A1 и Schafer et al. (2017) Nature 552: 110-115, оба из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

В WO 2017/103108 A1 (включенной в настоящий документ полностью посредством ссылки) описана профибротическая роль ИЛ-11 и определена терапевтическая полезность антагонистов опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов при лечении/предотвращении фиброза. В примере 2 и на фиг. 7A и 7B из WO 2017/103108 A1 продемонстрировано, что инкубация первичных фибробластов предсердий человека с рекомбинантным ИЛ-11 человека увеличивает отложение коллагена фибробластами, хорошо изученный фиброзный процесс. Было показано, что лечение нейтрализующим антителом против ИЛ-11 (но не изотипическим контрольным антителом) подавляет продуцирование коллагена, индуцированное стимуляцией фибробластов ТФР- β 1 (известным профибротическим стимулом). В примере 3 и на фиг. 10 из WO 2017/103108 A1 дополнительно продемонстрирована способность нейтрализующего антитела против ИЛ-11 подавлять повышенное продуцирование коллагена фибробластами предсердий человека в ответ на различные другие профибротические стимулы (ANG2, ТРФ, ЕТ-1). В примере 5.2 и на фиг. 20A-20E из WO 2017/103108 A1 приведены дополнительные данные, свидетельствующие о профибротической роли ИЛ-11 в ткани сердца. Было показано, что фибробласты предсердий человека демонстрируют значимо повышенное продуцирование компонентов внеклеточного матрикса (коллагена, периостина) и повышенную экспрессию профибротических маркеров (α SMA, ИЛ-6, MMP2, TIMP1) в ответ на обработку белком ИЛ-11 человека, аналогично повышению продуцирования указанных факторов в ответ на обработку профибротическим стимулом ТФР- β 1. В примере 5.3.1 и на фиг. 38A-38D из WO 2017/103108 A1 сходным образом продемонстрировано повышенное продуцирование компонентов внеклеточного матрикса и повышенная экспрессия маркеров фиброза первичными фибробластами печени человека в ответ на обработку ИЛ-11 человека, а также способность нейтрализующего антитела против ИЛ-11 подавлять профибротические эффекты стимуляции ТФР- β 1. На фиг. 22A-22F и 23A-23B из WO 2017/103108 A1 продемонстрировано, что опосредованный ТФР- β 1 фиброз может быть ингибирован путем обработки нейтрализующим антителом против ИЛ-11, а на фиг. 24, кроме того, показано, что связывающие ИЛ-11 молекулы рецепторов-ловушек, нейтрализующие антитела против ИЛ-11R α и олигонуклеотиды, кодирующие мРНК для антисмыслового нокдауна генной экспрессии ИЛ-11 и ИЛ-11RA, аналогичным образом способны ингибировать опосредованный ТФР- β 1 переход фибробластов в миофибробласты (эффекторные клетки фиброза). Дополнительные данные, демонстрирующие ингибирование опосредованного ТФР- β 1 фибротического ответа при применении рецепторов-ловушек ИЛ-11, приведены на фиг. 32A и 32B из WO 2017/103108 A1. В примере 5.3.3 и на фиг. 21B и 21C из WO 2017/103108 A1 представлены *in vivo* данные, демонстрирующие профибротическую роль ИЛ-11 в разнообразных тканях. Инъекции мышам рекомбинантного ИЛ-11 мыши вызывало увеличение относительной массы сердца, почек, легких и печени (фиг. 21B), что было ассоциировано с повышенным содержанием коллагена в указанных тканях (фиг. 21C). Дополнительные *in vivo* данные, подтверждающие профибротическую роль ИЛ-11, представлены в примерах 7.2 и 7.3 и на фиг. 27A-27D и фиг. 28 из WO 2017/103108 A1. Указанные эксперименты демонстрируют, что нокаутные по ИЛ-11RA мыши защищены от фиброза тканей сердца и почек, индуцируемого профибротическими стимулами, что указывает на передачу сигналов через рецептор ИЛ-11 в качестве важного посредника фиброзных процессов. Также на фиг. 31A и 31B, и обобщенно на подписях к фиг. 31 из WO 2017/103108 A1 описан детектированный на срезах глаз мышей дикого типа фиброз, более выраженный по сравнению с нокаутными по ИЛ-11RA мышами через 7 дней после трабекулэктомии. Соответственно, в WO 2017/103108 A1 приведены подробные данные как *in vitro*, так и *in vivo* исследований, подтверждающие, что передача сигналов ИЛ-11/ИЛ-11R представляет собой ключевой посредник для фиброза в широком диапазоне тканей, и демонстрирующие, что ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов уменьшает фиброз, по оценке в анализах на различные маркеры фибротического ответа.

Антигенсвязывающие молекулы, способные к связыванию с ИЛ-11

Согласно настоящему изобретению предложены антигенсвязывающие молекулы, способные к связыванию с ИЛ-11.

Термин "антигенсвязывающая молекула" относится к молекуле, способной к связыванию с целевым антигеном, и охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические и мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител (например, Fv, scFv, Fab, scFab, F(ab')₂, Fab₂, диатела, триатела, scFv-Fc, минитела, однодоменные антитела (например, VhH) и т.п.), при условии, что они демонстрируют связывание с релевантной целевой молекулой

(молекулами). В термин "антитело" авторы настоящего изобретения включают фрагменты и их производные, в том числе синтетические антитела и фрагменты. В настоящем документе антитело представляет собой полипептид, способный к специфическому связыванию с релевантной целевой молекулой (т.е. антигеном, в отношении которого указанное антитело является специфическим). Антитела и антигенсвязывающие молекулы в соответствии с настоящим изобретением могут быть представлены в выделенной форме.

Благодаря наличию современных методик в области технологии моноклональных антител могут быть получены антитела для большинства антигенов. Антигенсвязывающая часть может представлять собой часть антитела (например, Fab-фрагмент) или синтетический фрагмент антитела (например, одноцепочечный Fv-фрагмент [ScFv]). Подходящие моноклональные антитела для выбранных антигенов могут быть получены с применением известных методик, например, описанных в источниках: "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) и "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G RHurrell (CRC Press, 1982). Химерные антитела обсуждали Neuberger с соавторами (Neuberger et al., 1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799).

Моноклональные антитела (mAb) подходят для применения в способах согласно настоящему изобретению и представляют собой гомогенную популяцию антител, специфически нацеленных на единственный эпитоп на антигене.

Могут также применяться/предоставляться антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как Fab- и Fab₂-фрагменты, а также генетически сконструированные антитела и фрагменты антител. Вариабельные домены тяжелых цепей (V_H) и вариабельные домены легких цепей (V_L) антитела вовлечены в распознавание антигенов, что было впервые обнаружено в ходе ранних экспериментов с расщеплением протеазами. Дополнительное подтверждение было найдено при "гуманизации" антител грызунов. Происходящие от грызунов вариабельные домены могут быть слиты с константными доменами, происходящими от человека, таким образом, что итоговое антитело сохраняет антигенную специфичность исходного антитела грызуна (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sc. USA 81, 6851-6855).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению представляет собой полностью человеческие антитело/фрагмент антитела. Полностью человеческое антитело/фрагмент антитела кодирует последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты человека. В полностью человеческих антителах/фрагментах антител отсутствуют не человеческие последовательности аминокислот.

Две наиболее распространенных методики для получения полностью человеческих антител представлены следующими: (i) фаговый дисплей, когда гены антител человека экспрессируют в библиотеках фагового дисплея, и (ii) получение антител у трансгенных мышей, сконструированных таким образом, что они содержат гены антител человека (описание в источнике: Park and Smolen, *Advances in Protein Chemistry* (2001) 56: 369-421). Вкратце, при использовании методики фагового дисплея генов антител человека гены, кодирующие цепи V_H и V_L, получают путем ПЦР-амплификации и клонирования из "необученных" лимфоцитов человека, и собирают в библиотеку, из которой они могут быть экспрессированы либо в виде связанных дисульфидными связями Fab-фрагментов или одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv). Кодирующие Fab или scFv гены сливают с поверхностным белком оболочки нитевидного бактериофага, и затем Fab или scFv, способный к связыванию с представляющей интерес мишенью, может быть идентифицирован путем скрининга библиотеки с использованием антигена. Процедуры молекулярной эволюции или аффинного созревания могут применяться для усиления аффинности Fab/scFv-фрагмента. При использовании методики трансгенных мышей антигеном иммунизируют мышей, у которых эндогенные локусы генов Ig мыши были заменены путем гомологичной рекомбинации на гомологи человека, и получают моноклональное антитело с применением стандартной гибридомной технологии, что дает полностью человеческое моноклональное антитело.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению представляет собой антитело/фрагмент антитела мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело/фрагмент антитела может быть получен(о) с применением фагового дисплея с использованием необученной библиотеки генов антител человека.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению представляет собой химерное антитело/фрагмент антитела мыши/человека (например, антигенсвязывающую молекулу, содержащую вариабельные домены мыши и константные области человека). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула представляет собой гуманизованное антитело/фрагмент антитела (например, антигенсвязывающую молекулу, содержащую области CDR мыши и каркасные и константные области человека).

Химерная антигенсвязывающая молекула мыши/человека может быть получена из моноклонального антитела мыши посредством процесса химеризации, например, согласно описанию в источниках: *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*, Michael Steinitz (Editor), *Methods in Molecular Biology* 1060, Springer Protocols, Humana Press (2014), глава 8, в частности, раздел 3 главы 8.

Гуманизованная антигенсвязывающая молекула может быть получена из антитела мыши посредством процесса гуманизации, например, согласно описанию в источниках: *Human Monoclonal Antibodies:*

Methods and Protocols, Michael Steinitz (Editor), Methods in Molecular Biology 1060, Springer Protocols, Humana Press (2014), глава 7, в частности раздел 3.1 главы 7, озаглавленный 'Antibody Humanization' ("Гуманизация антител").

Антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит фрагмент, способный к связыванию с целевым антигеном (антигенами). Согласно некоторым вариантам реализации указанный фрагмент, способный к связыванию с целевым антигеном, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела и вариабельную область легкой цепи (VL) антитела, способного к специфическому связыванию с целевым антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации указанный фрагмент, способный к связыванию с целевым антигеном, содержит аптамер или состоит из аптамера, способного к связыванию с целевым антигеном, например, аптамера нуклеиновой кислоты (описанного, например, в источнике: Zhou and Rossi *Nat Rev Drug Discov.* 2017 16(3): 181-202). Согласно некоторым вариантам реализации указанный фрагмент способен к связыванию с целевым антигеном содержит антигенсвязывающий пептид/полипептид или состоит из антигенсвязывающего пептида/полипептида, например, пептидного аптамера, тиоредоксина, монотела, антикалина, домена Куница, авимера, ноттина, финомера, атримера, дарпина (DARPin), аффитела, нанотела (т.е. однодоменного антитела (sdAb)) аффилина, белка с повторами броненосца (ArmRP), антитела OBody или фибронектина - описанных, например, в источнике: Reverdatto et al., *Curr Top Med Chem.* 2015; 15(12): 1082-1101, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки (см. также например, Voersma et al., *J Biol Chem* (2011) 286:41273-85 и Emanuel et al., *Mabs* (2011) 3:38-48).

Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению обычно содержат антигенсвязывающий домен, содержащий VH и VL антитела, способного к специфическому связыванию с целевым антигеном. Антигенсвязывающий домен, образованный VH и VL, могут также называться в настоящем документе Fv-областью.

Антигенсвязывающая молекула может представлять собой или может содержать антигенсвязывающий полипептид, или антигенсвязывающий полипептидный комплекс. Антигенсвязывающая молекула может содержать более одного полипептида, вместе образующих антигенсвязывающий домен. Указанные полипептиды могут связываться ковалентно или нековалентно. Согласно некоторым вариантам реализации указанные полипептиды образуют часть большего полипептида, содержащего указанные полипептиды (например, в случае scFv - содержащие VH и VL, или в случае scFab-содержащие VH-CH1 и VL-CL).

Антигенсвязывающая молекула может относиться к нековалентному или ковалентному комплексу более чем из одного полипептида (например, 2, 3, 4, 6 или 8 полипептидов), например, IgG-подобной антигенсвязывающей молекуле, содержащей два полипептида тяжелых цепей и два полипептида легкой цепи.

Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут быть разработаны и получены с применением последовательностей моноклональных антител (mAb), способных к связыванию с ИЛ-11. Могут также быть использованы/обеспечены антигенсвязывающие области антител, такие как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab- и F(ab')₂-фрагменты. "Антигенсвязывающая область" представляет собой любой фрагмент антитела, способного к связыванию с мишенью, в отношении которой заданное антитело является специфическим.

Антитела обычно содержат шесть определяющих комплементарность областей CDR; три в вариабельной области тяжелой цепи (VH): HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 и три в вариабельной области легкой цепи (VL): LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3. Шесть областей CDR в совокупности определяют паратоп антитела, представляющий собой часть антитела, которая связывается с целевым антигеном.

С каждой стороны каждой CDR область VH и область VL содержат каркасные области (FR), которые обеспечивают скаффолд для областей CDR. Области VH содержат, в направлении от N-конца к C-концу, следующую структуру: N-конец-[HC-FR1]-[HC-CDR1]-[HC-FR2]-[HC-CDR2]-[HC-FR3]-[HC-CDR3]-[HC-FR4]-C-конец; а области VL содержат следующую структуру: N-конец-[LC-FR1]-[LC-CDR1]-[LC-FR2]-[LC-CDR2]-[LC-FR3]-[LC-CDR3]-[LC-FR4]-C-конец.

Существует несколько разных принятых способов определения областей CDR и областей FR, например, описанные в источниках: 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, согласно описанию в источнике: Retter et al., *Nucl. Acids Res.* (2005) 33 (suppl 1): D671-D674. Области CDR и области FR областей VH и областей VL клонов антител, описанных в настоящем документе, были определены в соответствии с системой Kabat.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит области CDR антигенсвязывающей молекулы, способной к связыванию с ИЛ-11. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит области FR антигенсвязывающей молекулы, способной к связыванию с ИЛ-11. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит области CDR и области FR антигенсвязывающей молекулы, способной к связыванию с ИЛ-11. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH и область VL антигенсвязывающей молекулы, спо-

собной к связыванию с ИЛ-11.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH и область VL, которые представляют собой область VH/VL или происходят из области VH/VL клона связывающего ИЛ-11 антитела, описанного в настоящем документе (например, клона антитела против ИЛ-11 01A, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01T, 01V, 02A, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02T, 02V, 03A, 03G, 03I, 03L, 03Q, 03S, 03T, 03V, BSN-3C6 (включая 3C6 VH 1, 3C6 VH 2, 3C6 VH 2.1, 3C6 VH 2.2, 3C6 VH 2.3, 3C6 VH 2.4 или 3C6 VH 2.5 и 3C6 VL1, 3C6 VL2, 3C6 VL1.1, 3C6 VL 1.2, 3C6 VL 1.3, 3C6 VL 1.4, 3C6 VL 2.1, 3C6 VL 2.2, 3C6 VL 2.3 или 3C6 VL 2.4), BSN-1H2, BSN-7D4, BSN-8H11).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 7, где область VL содержит замену остатка цистеина в положении 91 из SEQ ID NO: 7 на аминокислоту, не являющуюся цистеином. Согласно некоторым вариантам реализации аминокислота, не являющаяся цистеином, выбрана из аланина, глицина, изолейцина, лейцина, глутамина, серина, треонина или валина.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно - по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%, идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 9, где область VL содержит замену остатка цистеина в положении 91 из SEQ ID NO :9 на аминокислоту, не являющуюся цистеином. Согласно некоторым вариантам реализации аминокислота, не являющаяся цистеином, выбрана из аланина, глицина, изолейцина, лейцина, глутамина, серина, треонина или валина.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную, более предпочтительно по меньшей мере либо на 75%, либо на 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO:11, где область VL содержит замену остатка цистеина в положении 91 из SEQ ID NO: 11 на аминокислоту, не являющуюся цистеином. Согласно некоторым вариантам реализации аминокислота, не являющаяся цистеином, выбрана из аланина, глицина, изолейцина, лейцина, глутамина, серина, треонина или валина.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH, характеризующуюся менее чем 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 91. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула не содержит область VH, содержащую последовательность аминокислот или состоящую из последовательности аминокислот, которая представлена в SEQ ID NO: 91. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула не содержит пептид/полипептид, содержащий последовательность аминокислот или состоящий из последовательности аминокислот, которая представлена в SEQ ID NO :91.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL, характеризующуюся менее чем 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO:93. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула не содержит область VL, содержащую последовательность аминокислот или состоящую из последовательности аминокислот, которая представлена в SEQ ID NO:93. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула не содержит пептид/полипептид, содержащий последовательность аминокислот или состоящий из последовательности аминокислот, которая представлена в SEQ ID NO: 93.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с одним из пунктов (1) или (2) ниже:

(1) (01X) область VH, включающую следующие области CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 36

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 39,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей HC-CDR1, HC-CDR2 или HC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(2) (02X, 03X) область VH, включающую следующие области CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 37

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 40,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей HC-CDR1, HC-CDR2 или HC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с одним из пунктов (3)-(5) ниже:

(3) (01X) область VH, включающую следующие области FR:

HC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 65

HC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 67

HC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 68

HC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 70,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 или HC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

(4) (02X) область VH, включающую следующие области FR:

HC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 65

HC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 67

HC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 69

HC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 70,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 или HC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

(5) (03X) область VH, включающую следующие области FR:

HC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 66

HC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 67

HC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 69

HC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 70,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 или HC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH, содержащую области CDR в соответствии с одним из пунктов (1) или (2) выше и области FR в соответствии с одним из пунктов (3)-(5) выше.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с одним из пунктов (6)-(8) ниже:

(3). (6) (01X) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (1) и области FR в соответствии с (3).

(4). (7) (02X) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (2) и области FR в соответствии с (4).

(5). (8) (03X) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (2) и области FR в соответствии с (5).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с одним из пунктов (9)-(1) ниже:

(9) (01X) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 6.

(10) (02X) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 8.

(11) (03X) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 10.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (12)-(38) ниже:

(12) (01X) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 41

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 44

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 80,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(13) (01A) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 41

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 44

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 48,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(35) (03Q) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 43

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 46

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 52,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(36) (03S) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 43

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 46

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 53,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(37) (03T) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 43

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 46

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 54,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(38) (03V) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 43

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 46

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 55,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH, включающую области CDR в соответствии с (2) и область VL, включающую области CDR в соответствии с (22).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (39)-(41) ниже:

(39) (01X) область VL, включающую следующие области FR:

LC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 71

LC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 74

LC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 76

LC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 77,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 или LC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

(40) (02X) область VL, включающую следующие области FR:

LC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 72

LC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 75

LC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 76

LC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 78,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 или LC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

(41) (03X) область VL, включающую следующие области FR:

LC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 73

LC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 74

LC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 76

LC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 79,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 или LC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL, включающую области CDR в соответствии с одним из пунктов (12)-(38) выше, и области FR в соответствии с одним из пунктов (39)-(41) выше.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (42)-(68) ниже:

(42) (01X) область VL, включающую области CDR в соответствии с (12) и области FR в соответствии с (39);

(43) (01A) область VL, включающую области CDR в соответствии с (13) и области FR в соответствии с (39);

(44) (01G) область VL, включающую области CDR в соответствии с (14) и области FR в соответст-

вии с (39);

(45) (01I) область VL, включающую области CDR в соответствии с (15) и области FR в соответствии с (39);

(46) (01L) область VL, включающую области CDR в соответствии с (16) и области FR в соответствии с (39);

(47) (01Q) область VL, включающую области CDR в соответствии с (17) и области FR в соответствии с (39);

(48) (01S) область VL, включающую области CDR в соответствии с (18) и области FR в соответствии с (39);

(49) (01T) область VL, включающую области CDR в соответствии с (19) и области FR в соответствии с (39);

(50) (01V) область VL, включающую области CDR в соответствии с (20) и области FR в соответствии с (39);

(51) (02X) область VL, включающую области CDR в соответствии с (21) и области FR в соответствии с (40);

(52) (02A) область VL, включающую области CDR в соответствии с (22) и области FR в соответствии с (40);

(53) (02G) область VL, включающую области CDR в соответствии с (23) и области FR в соответствии с (40);

(54) (02I) область VL, включающую области CDR в соответствии с (24) и области FR в соответствии с (40);

(55) (02L) область VL, включающую области CDR в соответствии с (25) и области FR в соответствии с (40);

(56) (02Q) область VL, включающую области CDR в соответствии с (26) и области FR в соответствии с (40);

(57) (02S) область VL, включающую области CDR в соответствии с (27) и области FR в соответствии с (40);

(58) (02T) область VL, включающую области CDR в соответствии с (28) и области FR в соответствии с (40);

(59) (02V) область VL, включающую области CDR в соответствии с (29) и области FR в соответствии с (40);

(60) (03X) область VL, включающую области CDR в соответствии с (30) и области FR в соответствии с (41);

(61) (03A) область VL, включающую области CDR в соответствии с (31) и области FR в соответствии с (41);

(62) (03G) область VL, включающую области CDR в соответствии с (32) и области FR в соответствии с (41);

(63) (03I) область VL, включающую области CDR в соответствии с (33) и области FR в соответствии с (41);

(64) (03L) область VL, включающую области CDR в соответствии с (34) и области FR в соответствии с (41);

(65) (03Q) область VL, включающую области CDR в соответствии с (35) и области FR в соответствии с (41);

(66) (03S) область VL, включающую области CDR в соответствии с (36) и области FR в соответствии с (41);

(67) (03T) область VL, включающую области CDR в соответствии с (37) и области FR в соответствии с (41);

(68) (03V) область VL, включающую области CDR в соответствии с (38) и области FR в соответствии с (41).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (69)-(95) ниже:

(69) (01X) область VL, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 82.

(70) (01A) область VL, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 12.

(71) (01G) область VL, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью

ответствии с (100);

(108) (3С6 VH 2.3) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (96) и области FR в соответствии с (101);

(109) (3С6 VH 2.4) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (96) и области FR в соответствии с (102);

(110) (3С6 VH 2.5) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (96) и области FR в соответствии с (103).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с одним из пунктов (111)-(117) ниже:

(111) (3С6 VH 1) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 91;

(112) (3С6 VH 2) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 92;

(113) (3С6 VH 2.1) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 116;

(114) (3С6 VH 2.2) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 117;

(115) (3С6 VH 2.3) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 118;

(116) (3С6 VH 2.4) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 119;

(117) (3С6 VH 2.5) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 120.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с (118) или (119):

(118) (3С6 VL 1, 3С6 VL 1.1, 3С6 VL 1.2, 3С6 VL 1.3, 3С6 VL 1.4) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 98

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 99

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 100,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(119) (3С6 VL 2, 3С6 VL 2.1, 3С6 VL 2.2, 3С6 VL 2.3, 3С6 VL 2.4) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 101

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 102

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 103,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (120)-(129) ниже:

(120) (3С6 VL 1) область VL, включающую следующие области FR:

LC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 109

LC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 111

LC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 113

LC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 115,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 или LC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

HC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 167, или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 или HC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

(154) (7D4 VH) область VH, включающую следующие области FR:

HC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 182

HC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 183

HC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 184

HC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 185,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 или HC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

(155) (8H11 VH) область VH, включающую следующие области FR:

HC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 200

HC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 201

HC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 202

HC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 203,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 или HC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH, содержащую области CDRB соответствии с одним из пунктов (96) или (150)-(152) выше, и области FR в соответствии с одним из пунктов (97)-(103) или (153)-(155) выше.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с одним из пунктов (156)-(158) ниже:

(156) (1H2 VH) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (150) и области FR в соответствии с (153);

(157) (7D4 VH) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (151) и области FR в соответствии с (154);

(158) (8H11 VH) область VH, содержащую области CDR в соответствии с (152) и области FR в соответствии с (155).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с одним из пунктов (159)-(161) ниже:

(159) (1H2 VH) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 156;

(160) (7D4 VH) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 174;

(161) (8H11 VH) область VH, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 192.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (162)-(164) ниже:

(162) (1H2 VL) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 161

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 162

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 163,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(163) (7D4 VL) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 179

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 180

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 181,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

(164) (8H11 VL) область VL, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 197

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 198

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 199,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-CDR1, LC-CDR2 или LC-CDR3 заменены на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (165)-(167) ниже:

(165) (1H2 VL) область VL, включающую следующие области FR:

LC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 168

LC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 169

LC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 170

LC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 171,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 или LC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

(166) (7D4 VL) область VL, включающую следующие области FR:

LC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 186

LC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 187

LC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 188

LC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 189,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 или LC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

(167) (8H11 VL) область VL, включающую следующие области FR:

LC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 204

LC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 205

LC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 206

LC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 207,

или ее вариант, в котором одна, или две, или три аминокислоты в одной или более из областей LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 или LC-FR4 заменены на другую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL, включающую области CDR в соответствии с любым из пунктов (118), (119) или (162)-(164) выше, и области FR в соответствии с одним из пунктов (120)-(129) или (165)-(167) выше.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (168)-(170) ниже:

(168) (1H2 VL) область VL, включающую области CDR в соответствии с (162) и области FR в соответствии с (165);

(169) (7D4 VL) область VL, включающую области CDR в соответствии с (163) и области FR в соответствии с (166);

(170) (8H11 VL) область VL, включающую области CDR в соответствии с (164) и области FR в соответствии с (167).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VL в соответствии с одним из пунктов (171)-(173) ниже:

(171) (1H2 VL) область VL, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 157;

(172) (7D4 VL) область VL, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 175;

(173) (8H11 VL) область VL, содержащую последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 70% идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере либо 75%, либо 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 193.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с одним из пунктов (96)-(117) или (150)-(161), и область VL в соответствии с одним из пунктов (118)-(149) или (162)-(173).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с (150) и область VL в соответствии с (162).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с (159) и область VL в соответствии с (171).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с (151) и область VL в соответствии с (163).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с (160) и область VL в соответствии с (172).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область VH в соответствии с (152) и область VL в соответствии с (164).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит об-

ласть VH в соответствии с (161) и область VL в соответствии с (173).

Согласно некоторым вариантам реализации предложена антигенсвязывающая молекула, необязательно выделенная, способная связываться с ИЛ-11, которая содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 158

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 159

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 160; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 161

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 162

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 163.

Согласно некоторым вариантам реализации предложена антигенсвязывающая молекула, необязательно выделенная, способная связываться с ИЛ-11, которая содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 176

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 177

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 178; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 179

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 180

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 181.

Согласно некоторым вариантам реализации предложена антигенсвязывающая молекула, необязательно выделенная, способная связываться с ИЛ-11, которая содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 194

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 195

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 196; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 197

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 198

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 199.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых одна или более аминокислот заменены на другую аминокислоту, указанные замены могут представлять собой консервативные замены, например, в соответствии с приведенной ниже таблицей. Согласно некоторым вариантам реализации заменяют аминокислоты внутри одного блока из среднего столбца. Согласно некоторым вариантам реализации заменяют аминокислоты внутри одной строки из правого столбца:

АЛИФАТИЧЕСКИЕ	Неполярные	G A P
		I L V
	Полярные – незаряженные	C S T M
		N Q
Полярные – заряженные	D E	
	K R	
АРОМАТИЧЕСКИЕ		H F W Y

Согласно некоторым вариантам реализации замена (замены) могут быть функционально консервативными. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации указанная замена может не влиять (или может по существу не влиять) на одно или более функциональных свойств (например, целевое связывание) антигенсвязывающей молекулы, содержащей указанную замену, по сравнению с эквивалентной незамещенной молекулой.

Согласно некоторым вариантам реализации замена (замены) относительно референсной последовательности VH или VL могут быть сосредоточены в конкретной области или областях последовательности VH или VL. Например, вариации референсной последовательности VH или VL могут быть сосредоточены в одной или более из каркасных областей (FR1, FR2, FR3 и/или FR4).

Области VH и VL антигенсвязывающей области антитела вместе составляют Fv-область. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением содержит Fv-область или состоит из Fv-области, которая связывается с ИЛ-11. Согласно некоторым вариантам реализации предложены области VH и VL Fv в виде одного полипептида, объединенного линкерной областью, т.е. одноцепочечного Fv (scFv).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит одну или более областей константной последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой или происходит из константной последовательности тяжелой цепи IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (например, IgA1, IgA2), IgD, IgE или IgM.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой константную последовательность иммуноглобулина G 1 человека (IGHG1; UniProt: P01857-1, v1; SEQ ID NO: 85). Положения 1-98 из SEQ ID NO: 85 образуют область CH1 (SEQ ID NO: 86). Положения 99-110 из SEQ ID NO: 85 образуют шарнирную область между областями CH1 и CH2 (SEQ ID NO: 87). Положения 111-223 из SEQ ID NO: 85 образуют область CH2 (SEQ ID NO: 88). Положения 224-330 из SEQ ID NO: 85 образуют область CH3 (SEQ ID NO: 89).

Согласно некоторым вариантам реализации область CH1 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 86, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 86. Согласно некоторым вариантам реализации шарнирная область CH1-CH2 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 87, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 87. Согласно некоторым вариантам реализации область CH2 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 88, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 88. Согласно некоторым вариантам реализации область CH3 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 89 или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 89.

Согласно некоторым вариантам реализации константная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой константную область иммуноглобулина G 4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1; SEQ ID NO: 211). Положения 1-98 из SEQ ID NO: 211 образуют область CH1 (SEQ ID NO: 212). Положения 99-110 из SEQ ID NO: 61 образуют шарнирную область между областями CH1 и CH2 (SEQ ID NO: 213). Положения 111-220 из SEQ ID NO: 211 образуют область CH2 (SEQ ID NO: 214). Положения 221-327 из SEQ ID NO: 211 образуют область CH3 (SEQ ID NO: 215).

Согласно некоторым вариантам реализации область CH1 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 212, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 212. Согласно некоторым вариантам реализации шарнирная область CH1-CH2 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 213, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 213. Согласно некоторым вариантам реализации область CH2 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 214, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 214. Согласно некоторым вариантам реализации область CH3 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 215 или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 215.

Согласно некоторым вариантам реализации константная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой константную последовательность иммуноглобулина G4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1), содержащую замену аминокислот, которая придает улучшенные свойства антигенсвязывающим молекулам согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации константная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность IgG4 человека с заменами S241P и/или L248E. Мутация S241P стабилизирует шарнир, тогда как мутация L248E дополнительно уменьшает и так незначительную эффекторную АЗКЦ-функцию IgG4 (Davies and Sutton, Immunol Rev. 2015 Nov; 268(1):139-159; Angal et al Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8). Более низкая АЗКЦ-активность благоприятна для потенциального подкожного введения антителя.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой константную последовательность иммуноглобулина G4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1), содержащую замену S241P (нумерация в соответствии с системой Kabat), согласно SEQ ID NO: 216. Положения 1-98 из SEQ ID NO: 216 образуют область CH1 (SEQ ID NO: 62). Положения 99-110 из SEQ ID NO: 216 образуют шарнирную область между областями CH1 и CH2 (SEQ ID NO: 217), содержащую замену S241P. Положения 111-220 из SEQ ID NO: 216 образуют

область CH2 (SEQ ID NO: 214). Положения 221-327 из SEQ ID NO: 216 образуют область CH3 (SEQ ID NO: 215).

Согласно некоторым вариантам реализации область CH1 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 212, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 212. Согласно некоторым вариантам реализации шарнирная область CH1-CH2 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 217, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 217. Согласно некоторым вариантам реализации область CH2 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 214, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 214. Согласно некоторым вариантам реализации область CH3 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 215, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 215.

Согласно некоторым вариантам реализации константная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой константную последовательность иммуноглобулина G4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1), содержащую замены S241P и L248E (нумерация в соответствии с системой Kabat), согласно SEQ ID NO: 218. Положения 1-98 из SEQ ID NO: 218 образуют область CH1 (SEQ ID NO: 212). Положения 99-110 из SEQ ID NO: 218 образуют шарнирную область между областями CH1 и CH2 (SEQ ID NO: 217), содержащую замену S241P. Положения 111-220 из SEQ ID NO: 218 образуют область CH2 (SEQ ID NO: 219), содержащую замену L248E. Положения 221-327 из SEQ ID NO: 218 образуют область CH3 (SEQ ID NO: 215).

Согласно некоторым вариантам реализации область CH1 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 212, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 212. Согласно некоторым вариантам реализации шарнирная область CH1-CH2 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 217, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 217. Согласно некоторым вариантам реализации область CH2 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 219, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 219. Согласно некоторым вариантам реализации область CH3 содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 215, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 215.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит одну или более областей константная последовательность легкой цепи иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации константная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представляет собой константную область цепи каппа иммуноглобулина человека (IGKC; Ск; UniProt: P01834-1, v2; SEQ ID NO: 90). Согласно некоторым вариантам реализации константная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представляет собой константную последовательность цепи лямбда иммуноглобулина человека (IGLC; Cλ), например, IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 или IGLC7 (SEQ ID NO: 231, 232, 233, 234 или 235). Согласно некоторым вариантам реализации область CL содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 90, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 90. Согласно некоторым вариантам реализации область CL содержит последовательность или состоит из последовательности из SEQ ID NO: 231, 232, 233, 234 или 235, или содержит последовательность или состоит из последовательности, которая по меньшей мере на 60%, предпочтительно либо на 70%, либо на 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 231, 232, 233, 234 или 235.

Область VL и константная область легкой цепи (CL), и область VH и константная область тяжелой цепи 1 (CH1) антигенсвязывающей области антитела вместе составляют область Fab. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит область Fab, содержащую VH, CH1, VL и CL (например, Ск или Сλ). Согласно некоторым вариантам реализации область Fab содержит полипептид, содержащий VH и CH1 (например, слитый полипептид VH-CH1), и полипептид, содержащий VL и CL (например, слитый полипептид VL-CL). Согласно некоторым вариантам реализации область Fab содержит полипептид, содержащий VH и CL (например, слитый полипептид VH-CL), и полипептид, содержащий VL и CH (например, слитый полипептид VL-CH1); соответственно, согласно некоторым вариантам реализации область Fab представляет собой область CrossFab. Согласно некоторым вариантам реализации предложены области VH, CH1, VL и CL Fab или CrossFab в виде одного полипептида, объединенного линкерными областями, т.е. в виде одноцепочечного Fab (scFab) или одноцепочечного CrossFab (scCrossFab).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит область или состоит из области Fab, которая связывается с ИЛ-11.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула, описанная в настоящем документе, содержит целое антитело или состоит из целого антитела, которое связывается с ИЛ-11. В настоящем документе "целое антитело" относится к антителу, содержащему структуру, которая по существу аналогична структуре иммуноглобулина (Ig). Разные виды иммуноглобулинов и их структуры описаны, например, в источнике: Schroeder and Cavacini J Allergy Clin Immunol. (2010) 125(202): S41-S52, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Имуноглобулины типа G (т.е. IgG) представляют собой гликопротеины размером ~150 кДа, содержащие две тяжелых цепи и две легких цепи. Тяжелые цепи содержат, в направлении от N-конца к C-концу, VH, за которой следует константная область тяжелой цепи, содержащая три константных домена (CH1, CH2 и CH3); аналогичным образом, 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 (например, IgA1, IgA2), IgD, IgE или IgM. Легкая цепь может представлять собой цепь каппа (κ) или лямбда (λ).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула, описанная в настоящем документе содержит или состоит из IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (например, IgA1, IgA2), IgD, IgE или IgM, который связывается с ИЛ-11.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению характеризуется по меньшей мере моновалентным связыванием с ИЛ-11. Валентность связывания относится к числу сайтов связывания определенной антигенной детерминанты в антигенсвязывающей молекуле. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере один сайт связывания ИЛ-11.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит более одного сайта связывания ИЛ-11, например 2, 3 или 4 сайта связывания. Сайты связывания могут быть одинаковыми или разными. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула, например, является бивалентной, трехвалентной или тетравалентной в отношении ИЛ-11.

Аспекты настоящего изобретения относятся к мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам. Под "мультиспецифическим" подразумевается, что антигенсвязывающая молекула демонстрирует специфическое связывание более чем с одной мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере два разных антигенсвязывающих домена (т.е. по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, например, содержащих неидентичные VH и VL).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула связывается с ИЛ-11 и другой мишенью (например, антигеном, не являющимся ИЛ-11), и, соответственно, является, по меньшей мере, биспецифической. Термин "биспецифический" означает, что антигенсвязывающая молекула способна специфически связываться по меньшей мере с двумя отдельными антигенными детерминантами.

Следует понимать, что антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением (например, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула) может содержать антигенсвязывающие молекулы, способные к связыванию с мишенями, в отношении которых указанная антигенсвязывающая молекула является специфической. Например, антигенсвязывающая молекула, способная к связыванию с ИЛ-11 и антигеном, не являющимся ИЛ-11, может содержать: (i) антигенсвязывающую молекулу, способную к связыванию с ИЛ-11, и (ii) антигенсвязывающую молекулу, способную к связыванию с антигеном, который не является ИЛ-11.

Также стоит отметить, что антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением (например, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула) может содержать антигенсвязывающие молекулы, способные к связыванию с мишенями, в отношении которых указанная антигенсвязывающая молекула является специфической.

вающие полипептиды или антигенсвязывающие полипептидные комплексы, способные к связыванию с мишенями, в отношении которых указанная антигенсвязывающая молекула является специфической. Например, антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением может содержать, например, (i) антигенсвязывающий полипептидный комплекс, способный к связыванию с ИЛ-11, содержащий полипептид легкой цепи (содержащий структуру VL-CL) и полипептид тяжелой цепи (содержащий структуру VH-CH1-CH2-CH3), и (ii) антигенсвязывающий полипептидный комплекс, способный к связыванию с антигеном, который не является ИЛ-11, содержащий полипептид легкой цепи (содержащий структуру VL-CL) и полипептид тяжелой цепи (содержащий структуру VH-CH1-CH2-CH3).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула - компонент большей антигенсвязывающей молекулы (например, мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы) может называться, например, "антигенсвязывающим доменом" или "антигенсвязывающей областью" большей антигенсвязывающей молекулы.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула включает антигенсвязывающую молекулу, способную к связыванию с ИЛ-11, и антигенсвязывающую молекулу, способную к связыванию с антигеном, который не является ИЛ-11. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антиген, не являющийся ИЛ-11, представляет собой молекулу поверхности иммунной клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антиген, не являющийся ИЛ-11, представляет собой антиген раковой клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антиген, не являющийся ИЛ-11, представляет собой рецепторную молекулу, например, рецептор клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антиген, не являющийся ИЛ-11, представляет собой сигнальную молекулу клетки, например цитокин, хемокин, интерферон, интерлейкин или лимфокин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антиген, не являющийся ИЛ-11, представляет собой фактор роста или гормон.

Антиген раковой клетки представляет собой антиген, который экспрессируется или сверхэкспрессируется раковой клеткой. Антиген раковой клетки может представлять собой любой пептид/полипептид, гликопротеин, липопротеин, гликан, гликолипид, липид или его фрагмент. Экспрессия антигена раковой клетки может быть ассоциирована с раком. Антиген раковой клетки может аномально экспрессироваться раковой клеткой (например, антиген раковой клетки может экспрессироваться в аномальном местоположении) или может экспрессироваться раковой клеткой с аномальной структурой. Антиген раковой клетки может быть способен вызывать иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антиген экспрессируется на поверхности раковой клетки (т.е. антиген раковой клетки представляет собой раковый антиген клеточной поверхности). Согласно некоторым вариантам реализации часть антигена, связываемая антигенсвязывающей молекулой, описанной в настоящем документе, экспонирована на внешней поверхности раковой клетки (т.е. является внеклеточной). Антиген раковой клетки может представлять собой ассоциированный с раком антиген. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антиген раковой клетки представляет собой антиген, экспрессия которого ассоциирована с развитием, прогрессированием или тяжестью симптомов рака. Ассоциированный с раком антиген может быть ассоциирован с причиной или патологией рака, или его аномальная экспрессия может быть следствием рака. Согласно некоторым вариантам реализации антиген раковой клетки представляет собой антиген, экспрессию которого повышающе регулируют (например, на уровне РНК и/или белка) клетки рака, например, по сравнению с уровнем экспрессии сопоставимыми нераковыми клетками (например, нераковыми клетками, происходящими из того же типа ткани/клеток). Согласно некоторым вариантам реализации указанный ассоциированный с раком антиген может преимущественно экспрессироваться раковыми клетками и не экспрессироваться сопоставимыми нераковыми клетками (например, нераковыми клетками, происходящими из того же типа ткани/клеток). Согласно некоторым вариантам реализации указанный ассоциированный с раком антиген может быть продуктом мутированного онкогена или мутированного гена-супрессора опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ассоциированный с раком антиген может быть продуктом сверхэкспрессируемого клеточного белка, раковым антигеном, продуцируемым онкогенным вирусом, онкофетальным антигеном или гликопротеином клеточной поверхности.

Молекула поверхности иммунной клетки может представлять собой любой пептид/полипептид, гликопротеин, липопротеин, гликан, гликолипид, липид или его фрагмент, экспрессируемый в клеточной поверхности или на клеточной поверхности иммунной клетки. Согласно некоторым вариантам реализации часть молекулы поверхности иммунной клетки, которую связывает антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению, находится на внешней поверхности иммунной клетки (т.е. является внеклеточной). Молекула поверхности иммунной клетки может экспрессироваться на клеточной поверхности любой иммунной клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанная иммунная клетка может представлять собой клетку гематopoэтического происхождения, например, нейтрофил, эозинофил, базофил, дендритную клетку, лимфоцит или моноцит. Лимфоцит может представлять собой, например, Т-клетку, В-клетку, естественную киллерную (NK) клетку, NKT-клетку или лимфоидную клетку врожденного иммунитета (ILC) или ее предшественник (например, тимоцит или предшественник В-клетки). Согласно некоторым вариантам реализации указанная молекула поверхности иммунной клетки может

представлять собой костимулирующую молекулу (например, CD28, OX40, 4-1BB, ICOS или CD27) или ее лиганд. Согласно некоторым вариантам реализации указанная молекула поверхности иммунной клетки может представлять собой ингибитор контрольной точки (например, PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT или BTLA) или ее лиганд.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы в соответствии с настоящим изобретением могут быть представлены в любом подходящем формате, таком как форматы, описанные в источнике: Brinkmann and Kontermann MAbs (2017) 9(2): 182-212, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Подходящие форматы включают представленные на фиг. 2 в источнике: Brinkmann and Kontermann MAbs (2017) 9(2): 182-212: конъюгаты антител например IgG₂, F(ab')₂ или CovX-Body; IgG или IgG-подобные молекулы, например IgG, химерный IgG, антитело каппа-лямбда (κλ-тело), общие HC; слитые белки CH1/CL, например scFv₂-CH1/CL, VHH2-CH1/CL; содержащие только переменные домены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, например tandemные scFv (taFv), антитела Triplebody, диатела (Db), dsDb, Db(kih), DART, scDB, dsFv-dsFv, антитела TandAb, антитела с "тройным зарядом" ("triple heads"), tandemные dAb/VHH, тетравалентные dAb.VHH; слитые неиммуноглобулиновые белки, например scFv₂-альбумин, scDb-альбумин, taFv-альбумин, taFv-токсин, мини-антитело, DNL-Fab₂, DNL-Fab₂-scFv, DNL-Fab₂-IgG-цитокин₂, ImmTAC (TCR-scFv); модифицированные слитые белки Fc и CH₃, например, scFv-Fc(kih), scFv-Fc (зарядные пары в CH₃), scFv-Fc (EW-RVT), scFv-fc (HA-TF), scFv-Fc (SEEDbody), taFv-Fc(kih), scFv-Fc(kih)-Fv, Fab-Fc(kih)-scFv, Fab-scFv-Fc(kih), Fab-scFv-Fc(BEAT), Fab-scFv-Fc (SEEDbody), DART-Fc, scFv-CH₃(kih), TriFab; слитые Fc, например, диатело, scDb-Fc, taFv-Fc, scFv-Fc-scFv, HCab-VHH, Fab-scFv-Fc, scFv₄-Ig, scFv₂-Fcab; слитые CH₃, например, диа-диатело, scDb-CH₃; слитые IgE/IgM CH₂, например scFv-EHD₂-scFv, scFvMHD₂-scFv; слитые белки Fab, например Fab-scFv (битело), Fab-scFv₂ (тритело), Fab-Fv, Fab-dsFv, Fab-VHH, ортогональные Fab-Fab; слитые с неиммуноглобулиновыми молекулами белки, например, DNL-Fab₃, DNL-Fab₂-scFv, DNL-Fab₂-IgG-цитокин₂; асимметричные IgG или IgG-подобные молекулы, например IgG(kih), общие LC IgG(kih), общие LC IgG ZW1, общие LC Biclomics, CrossMab, CrossMab(kih), scFab-IgG(kih), Fab-scFab-IgG(kih), ортогональный Fab IgG(kih), DuetMab, зарядные пары в CH₃ + зарядные пары в CH1/CL, зарядные пары в шарнире/CH₃, антитело SEED-body, Duobody, CrossMab(kih) "четыре в одном", общие LC LUZ-Y; scFab-IgG LUZ-Y, FcFc*; дополненные и Fc-модифицированные IgG, например, IgG(kih)-Fv, IgG HA-TF-Fv, IgG(kih)scFab, scFab-Fc(kih)-scFv₂, scFab-Fc(kih)-scFv, полу-DVD-Ig, DVI-Ig ("четыре в одном"), CrossMab-Fab; модифицированные слитые белки Fc и CH₃, например Fab-Fc(kih)-scFv, Fab-scFv-Fc(kih), Fab-scFv-Fc(BEAT), Fab-scFv-Fc-SEEDbody, TriFab; дополненные слитые с HC IgG, например IgG-HC, scFv, IgG-dAb, IgG-taFv, IgG-CrossFab, IgG-ортогональный Fab, IgG-(CαCβ) Fab, scFv-HC-IgG, tandemные Fab-IgG (ортогональные Fab) Fab-IgG(CαCβ Fab), Fab-IgG(CR3), Fab-шарнир-IgG(CR3); дополненные слитые с LC IgG, например IgG-scFv(LC), scFv(LC)-IgG, dAb-IgG; дополненные слитые с HC и LC IgG, например DVD-Ig, TVD-Ig, CODV-Ig, scFv₄-IgG, антитело Zybody; слитые Fc, например Fab-scFv-Fc, scFv₄-Ig; слитые F(ab')₂, например F(ab')₂-scFv₂; слитые белки CH1/CL, например scFv₂-CH1-шарнир/CL; модифицированные IgG, например DAF (IgG типа "два в одном"), DutaMab, Mab²; и слитые с неиммуноглобулиновыми белками молекулы, например DNL-Fab₄-IgG.

Специалист способен разработать и получить биспецифические антигенсвязывающие молекулы. Способы получения биспецифических антигенсвязывающих молекул включают химическое перекрестное связывание антигенсвязывающих молекул или фрагментов антител, например, с редуцируемыми дисульфидными или нередуцируемыми тиоэфирными связями, например, согласно описанию в источнике: Segal and Bast, 2001. Production of Bispecific Antigen-binding molecules. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Например, N-сукцинимидил-3-(-2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) может применяться для химического перекрестного связывания, например, Fab-фрагментов через SH-группы шарнирных областей с получением связанных дисульфидными связями биспецифических гетеродимеров F(ab)₂.

Другие способы получения биспецифических антигенсвязывающих молекул включают слияние продуцирующих антитело гибридом, например, с полиэтиленгликолем с получением квадромной клетки, способной секретировать биспецифическое антитело, например, согласно описанию в источнике: D. M. and Bast, B. J. 2001. Production of Bispecific Antigen-binding molecules. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы в соответствии с настоящим изобретением могут также быть продуцированы рекомбинантным способом, путем экспрессии, например, с нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей полипептиды для антигенсвязывающих молекул, например, согласно описанию в источниках: Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition (Humana Press, 2012), в главе 40: Production of Bispecific Antigen-binding molecules: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and Färber-Schwarz) или French, How to make bispecific antigen-binding molecules, Methods Mol. Med. 2000; 40:333-339, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Например, ДНК-конструкция, кодирующая переменные домены легких и тяжелых цепей для двух антигенсвязывающих фрагментов (т.е. переменные домены легких и тяжелых цепей для антигенсвязываю-

шего фрагмента, способного к связыванию ИЛ-11, и переменные домены легких и тяжелых цепей для антигенсвязывающего фрагмента, способного к связыванию с другим целевым белком) и включающая последовательности, кодирующие подходящий линкер или домен димеризации между указанными антигенсвязывающими фрагментами, может быть получена с применением методик молекулярного клонирования. Рекомбинантное биспецифическое антитело может после этого быть продуцировано путем экспрессии (например, *in vitro*) указанной конструкции в подходящей клетке-хозяине (например, клетке-хозяине млекопитающего), а затем экспрессированное рекомбинантное биспецифическое антитело может необязательно быть очищено.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат Fc-область. Fc-область состоит из областей CH2 и CH3 из одного полипептида и областей CH2 и CH3 из другого полипептида. Области CH2 и CH3 из указанных двух полипептидов в совокупности образуют Fc-область.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит Fc-область, содержащую модификацию в одной или более из областей CH2 и CH3, способствующую связыванию Fc-области. Рекомбинантная коэкспрессия полипептидов-составляющих антигенсвязывающей молекулы и последующее связывание приводит к получению нескольких возможных комбинаций. Для улучшения выхода требуемых комбинаций полипептидов в антигенсвязывающих молекулах при рекомбинантном получении благоприятным является введение в Fc-области модификации (модификаций), способствующей (способствующих) связыванию требуемой комбинации полипептидов тяжелых цепей. Модификации могут способствовать, например, гидрофобному и/или электростатическому взаимодействию между областями CH2 и/или CH3 разных полипептидных цепей. Подходящие модификации описаны, например, в источнике: Na et al., *Front. Immunol* (2016) 7:394, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит Fc-область, содержащую парные замены в областях CH3 указанной Fc-области в соответствии с одним из следующих форматов, представленных в табл. 1 в источнике Na et al., *Front. Immunol* (2016) 7:394: KiH, KiH_{s-s}, HA-TF, ZW1, 7.8.60, DD-KK, EW-RVT, EW-RVT_{s-s}, SEED или A107.

Полипептиды

Согласно настоящему изобретению также предложены полипептидные компоненты антигенсвязывающих молекул. Указанные полипептиды могут быть представлены в выделенной или по существу очищенной форме.

Антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению может представлять собой или может содержать комплекс полипептидов.

Если в настоящем описании сказано, что полипептид содержит более одного домена или одной области, следует понимать, что предпочтительно в одной и той же полипептидной цепи присутствуют несколько доменов/областей. Соответственно, полипептид, который содержит более одного домена или одной области, представляет собой слитый полипептид, содержащий указанные домены/области.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит VH или состоит из VH согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит VL или состоит из VL согласно описанию в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид дополнительно содержит одну или более константных областей тяжелых цепей (CH) антитела. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид дополнительно содержит одну или более константных областей легкой цепи (CL) антитела. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит область CH1, CH2 и/или область CH3 иммуноглобулина (Ig).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит одну или более областей константной последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит область CH1 согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит шарнирную область CH1-CH2 согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит область CH2 согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит область CH3 согласно описанию в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит область CH3, содержащую любую из замен аминокислот/комбинаций замен аминокислот, приведенных в табл. 1 в источнике: Na et al., *Front. Immunol* (2016) 7:394, включенном в настоящий документ посредством ссылок здесь и выше.

Согласно некоторым вариантам реализации области CH2 и/или CH3 указанного полипептида содержат одну или более замен аминокислот, способствующих связыванию полипептида с другим полипептидом, содержащим область CH2 и/или CH3.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит одну или более облас-

той константной последовательности легкой цепи иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит область CL согласно описанию в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит структуру в направлении от N-конца к C-концу, соответствующую одной из следующих:

- (i) VH
- (ii) VL
- (iii) VH-CH1
- (iv) VL-CL
- (v) VL-CH1
- (vi) VH-CL
- (vii) VH-CH1-CH2-CH3
- (viii) VL-CL-CH2-CH3
- (ix) VL-CH1-CH2-CH3
- (x) VH-CL-CH2-CH3

Также согласно настоящему изобретению предложены антигенсвязывающие молекулы, состоящие из полипептидов согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит одну из следующих комбинаций полипептидов:

- (A) VH + VL
- (B) VH-CH1 + VL-CL
- (C) VL-CH1 + VH-CL
- (D) VH-CH1-CH2-CH3 + VL-CL
- (E) VH-CL-CH2-CH3 + VL-CH1
- (F) VL-CH1-CH2-CH3 + VH-CL
- (G) VL-CL-CH2-CH3 + VH-CH1
- (H) VH-CH1-CH2-CH3 + VL-CL-CH2-CH3
- (I) VH-CL-CH2-CH3 + VL-CH1-CH2-CH3

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит более одного полипептида из комбинаций, представленных пунктами (A)-(I) выше. Например, в случае (D), выше, согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула содержит два полипептида, содержащих структуру VH-CH1-CH2-CH3, и два полипептида, содержащих структуру VL-CL.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит одну из следующих комбинаций полипептидов: (J) VH (против ИЛ-11) + VL (против ИЛ-11)

- (K) VH (против ИЛ-11)-CH1 + VL (против ИЛ-11)-CL
- (L) VL (против ИЛ-11)-CH1 + VH (против ИЛ-11)-CL
- (M) VH (против ИЛ-11)-CH1-CH2-CH3 + VL (против ИЛ-11)-CL
- (N) VH (против ИЛ-11)-CL-CH2-CH3 + VL (против ИЛ-11)-CH1
- (O) VL (против ИЛ-11)-CH1-CH2-CH3 + VH (против ИЛ-11)-CL
- (P) VL (против ИЛ-11)-CL-CH2-CH3 + VH (против ИЛ-11)-CH1
- (Q) VH (против ИЛ-11)-CH1-CH2-CH3 + VL (против ИЛ-11)-CL-CH2-CH3
- (R) VH (против ИЛ-11)-CL-CH2-CH3 + VL (против ИЛ-11)-CH1-CH2-CH3

где "VH (против ИЛ-11)" относится к VH антигенсвязывающей молекулы, способной к связыванию с ИЛ-11 согласно описанию в настоящем документе, например, согласно определенным в любом из пунктов (1)-(11), (96)-(117) или (150)-(161); а "VL (против ИЛ-11)" относится к VL антигенсвязывающей молекулы, способной к связыванию с ИЛ-11 согласно описанию в настоящем документе, например, согласно определенным в любом из пунктов (12)-(95), (118)-(149) или (162)-(173).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность или состоит из последовательности аминокислот, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно либо на 75%, либо на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот, представленной в одной из SEQ ID NO: 6-35, 82-84, 91-94, 116-128, 156, 157, 174, 175, 192, 193 или 210.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит полипептид, содержащий последовательность или состоящий из последовательности аминокислот, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно либо на 75%, либо на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 220. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит полипептид, содержащий последовательность или состоящий из последовательности аминокислот, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно либо на 75%, либо на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 221. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит полипептид, содержащий последо-

Линкеры и дополнительные последовательности

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающие молекулы и полипептиды согласно настоящему изобретению содержат одну или более линкерных последовательностей между последовательностями аминокислот. Может быть предложена линкерная последовательность на одном или обоих концах чего-либо одного или более из VH, VL, шарнирной области СН1-СН2, области СН2 и области СН3 антигенсвязывающей молекулы/антигенсвязывающего полипептида.

Линкерные последовательности известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в источнике: Chen et al., Adv Drug Deliv Rev (2013) 65(10): 1357-1369, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации линкерная последовательность может представлять собой гибкую линкерную последовательность. Гибкие линкерные последовательности обеспечивают относительную свободу движения последовательностей аминокислот, которые соединены указанной линкерной последовательностью. Гибкие линкеры известны специалисту в данной области техники, и несколько таких линкеров идентифицированы в источнике: Chen et al., Adv Drug Deliv Rev (2013) 65(10): 1357-1369. Гибкие линкерные последовательности часто содержат значительную долю остатков глицина и/или серина. Согласно некоторым вариантам реализации указанная линкерная последовательность содержит по меньшей мере один остаток глицина и/или по меньшей мере один остаток серина. Согласно некоторым вариантам реализации указанная линкерная последовательность состоит из остатков глицина и серина. Согласно некоторым вариантам реализации указанная линкерная последовательность имеет длину 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 или 1-10 аминокислот.

Антигенсвязывающие молекулы и полипептиды согласно настоящему изобретению могут, кроме того, содержать дополнительные аминокислоты или последовательности аминокислот. Например, указанные антигенсвязывающие молекулы и полипептиды могут содержать последовательность (последовательности) аминокислот для облегчения экспрессии, укладки, перемещения, процессинга, очищения или обнаружения антигенсвязывающей молекулы/антигенсвязывающего полипептида. Например, указанная антигенсвязывающая молекула/антигенсвязывающий полипептид может содержать последовательность, кодирующую His-метку (например, 6XHis), метку Myc, GST, MBP, FLAG, HA, E или биотинную метку, необязательно на N- или C-конце антигенсвязывающей молекулы/антигенсвязывающего полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула/антигенсвязывающий полипептид содержит детектируемый фрагмент, например, флуоресцентную, люминесцентную, иммунодетектируемую, радиометку, химическую, нуклеиновокислотную или ферментативную метку.

Антигенсвязывающие молекулы и полипептиды согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать сигнальный пептид (также известный как лидерная последовательность или сигнальная последовательность). Сигнальные пептиды обычно состоят из последовательности из 5-30 гидрофобных аминокислот, которые образуют одну альфа-спираль. Секретируемые белки и белки, экспрессируемые на клеточной поверхности, часто содержат сигнальные пептиды.

Сигнальный пептид может присутствовать на N-конце антигенсвязывающей молекулы/антигенсвязывающего полипептида, а также во вновь синтезируемых антигенсвязывающей молекуле/антигенсвязывающем полипептиде. Сигнальный пептид обеспечивает эффективное перемещение и секрецию антигенсвязывающей молекулы/антигенсвязывающего полипептида. Сигнальные пептиды часто удаляют путем расщепления; соответственно, они не содержатся в зрелой антигенсвязывающей молекуле/антигенсвязывающем полипептиде, секретируемом клеткой, которая экспрессирует антигенсвязывающую молекулу/антигенсвязывающий полипептид.

Сигнальные пептиды известны для многих белков и зарегистрированы в таких базах данных, как GenBank, UniProt, Swiss-Prot, TrEMBL, Protein Information Resource, Protein Data Bank, Ensembl и InterPro, и/или могут быть идентифицированы/предсказаны, например, с применением инструментов для анализа последовательностей аминокислот, таких как SignalP (Petersen et al., 2011 Nature Methods 8: 785-786) или Signal-BLAST (Frank and Sippl, 2008 Bioinformatics 24: 2172-2176).

Метки и конъюгаты

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению дополнительно содержат детектируемый фрагмент или химический фрагмент.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула содержит детектируемый фрагмент, например, флуоресцентную метку, фосфоресцирующую метку, люминесцентную метку, иммунодетектируемую метку (например, эпитопную метку), радиоактивную метку, химическую, нуклеиновокислотную или ферментативную метку. Указанная антигенсвязывающая молекула может быть ковалентно или нековалентно помечена детектируемым фрагментом.

Флуоресцентные метки включают, например, флуоресцеин, родамин, аллофикоцианин, эозин и NDB, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хелаты редкоземельных элементов, таких как европий (Eu), тербий (Tb) и самарий (Sm), тетраметилродамин, тещакский красный, 4-метилумбеллиферон, 7-амино-4-метилкумарин, Су3 и Су5. Радиоактивные метки включают радиоизотопы, такие как йод¹²³, йод¹²⁵, йод¹²⁶, йод¹³¹, йод¹³³, бром⁷⁷, технеций^{99m}, индий¹¹¹, индий^{113m}, галлий⁶⁷, галлий⁶⁸, рутений⁹⁵, рутений⁹⁷, рутений¹⁰³, рутений¹⁰⁵, ртуть²⁰⁷, ртуть²⁰³, рений^{99m}, рений¹⁰¹, рений¹⁰⁵, скандий⁴⁷, теллур^{121m}, теллур^{122m},

теллур ^{125m}, туллий ¹⁶⁵, туллий ¹⁶⁷, туллий ¹⁶⁸, медь ⁶⁷, фтор ¹⁸, иттрий ⁹⁰, палладий ¹⁰⁰, висмут ²¹⁷ и сурьма ²¹¹. Люминесцентные метки включают радиолюминесцентные, хемилюминесцентные (например, сложный эфир акридина, люминол, изолуинол) и биолюминесцентные метки. Иммунодетектируемые метки включают гаптены, пептиды/полипептиды, антитела, рецепторы и лиганды, такие как биотин, авидин, стрептавидин или дигоксигенин. Нуклеиновокислотные метки включают аптамеры. Ферментативные метки включают, например, пероксидазу, щелочную фосфатазу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу и люциферазу.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению конъюгированы с химическим фрагментом. Указанный химический фрагмент может представлять собой фрагмент, обеспечивающий терапевтический эффект. Конъюгаты антител с лекарственными средствами описаны, например, в источнике: Parslow et al., *Biomedicines*. 2016 Sep; 4(3):14. Согласно некоторым вариантам реализации указанный химический фрагмент может представлять собой фрагмент лекарственного средства (например, цитотоксический агент). Согласно некоторым вариантам реализации указанный фрагмент лекарственного средства может представлять собой химиотерапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный фрагмент лекарственного средства выбирают из калихеамицина, DM1, DM4, монометилауристината E (MMAE), монометилауристината F (MMAF), SN-38, доксорубицина, дуокармицина, D6.5 и PBD.

Функциональные свойства антигенсвязывающих молекул

Антигенсвязывающие молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть охарактеризованы на основании определенных функциональных свойств. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула, описанная в настоящем документе может обладать одним или более из следующих свойств:

- a) Специфическое связывание с ИЛ-11 (например, ИЛ-11 человека и/или ИЛ-11 мыши);
- b) Связывание с ИЛ-11 (например, ИЛ-11 человека) с аффинностью связывания EC50 = менее 1000 нг/мл, например, по оценке в ИФА ELISA;
- c) Ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11R α ;
- d) Ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и gp130;
- e) Ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и рецепторным комплексом ИЛ-11R α :gp130;
- f) Ингибирование взаимодействия между комплексом ИЛ-11: ИЛ-11R α и gp130;
- g) Ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11;
- h) Ингибирование передачи сигналов, опосредованной ИЛ-11;
- i) Ингибирование передачи сигналов, опосредованной связыванием ИЛ-11 с ИЛ-11R α :gp130 рецепторным комплексом;
- j) Ингибирование передачи сигналов, опосредованной связыванием комплекса ИЛ-11:ИЛ-11R α с gp130 (т.е. транс-передачи сигналов ИЛ-11);
- k) Ингибирование пролиферации фибробластов;
- l) Ингибирование образования миофибробластов из фибробластов;
- m) Обращение/регресс образования миофибробластов из фибробластов;
- n) Ингибирование образования миофибробластов из звездчатых клеток, например, звездчатых клеток печени или поджелудочной железы;
- o) Обращение/регресс образования миофибробластов из звездчатых клеток, например, звездчатых клеток печени или поджелудочной железы;
- p) Ингибирование миграционного и/или инвазивного поведения (т.е. ингибирование миграции и/или инвазии) фибробластов, звездчатых клеток или миофибробластов;
- q) Ингибирование присутствия иммунных клеток в органе;
- r) Ингибирование патологического процесса, опосредованного передачей сигналов ИЛ-11;
- s) Ингибирование фиброза;
- t) Обращение/регресс фиброза;
- u) Ингибирование в фибробластах или звездчатых клетках экспрессии гена или белка чего-либо одного или более из: коллагена, фибронектина, периостина, ИЛ-6, ИЛ-11, α SMA (ACTA2), TIMP1, MMP2, ФНО- α , CCL2, например, после стимуляции профибротическим фактором;
- v) Ингибирование продуцирования внеклеточного матрикса фибробластами или звездчатыми клетками;
- w) Ингибирование пролиферации и/или выживания клеток рака;
- x) Ингибирование развития и/или прогрессирования рака *in vivo*;
- y) Ингибирование роста опухоли;
- z) Киллинг клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11.

В настоящем документе "ингибирование" относится к снижению, уменьшению или ослаблению при сравнении с контрольными условиями. Например, ингибирование процесса антигенсвязывающей молекулой относится к снижению, уменьшению или ослаблению глубины/степени указанного процесса в отсутствие антигенсвязывающей молекулы и/или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы.

вающей молекулы.

Ингибирование может в настоящем документе также называться нейтрализацией или антагонизмом. Соответственно, связывающая ИЛ-11 антигенсвязывающая молекула, которая способна ингибировать функцию или процесс (например, взаимодействие, передачу сигналов или другую активность, опосредованную ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11), может быть названа антигенсвязывающей молекулой, "нейтрализующей" или "антагонистической" в отношении релевантной функции или процесса. Например, антигенсвязывающая молекула, которая способна ингибировать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов, может быть названа антигенсвязывающей молекулой, способной нейтрализовать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов, или может быть названа антагонистом опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов.

Специалист в данной области техники способен идентифицировать подходящие контрольные условия для определенного анализа. Например, контрольная антигенсвязывающая молекула может представлять собой антигенсвязывающую молекулу, направленную против целевого белка, которая, как известно, не имеет значения для исследуемого в указанном анализе свойства. Контрольная антигенсвязывающая молекула может относиться к тому же изотипу, что и анализируемая антигенсвязывающая молекула против ИЛ-11, и может, например, содержать те же константные области.

Антигенсвязывающие молекулы, описанные в настоящем документе, предпочтительно демонстрируют специфическое связывание с ИЛ-11. В настоящем документе "специфическое связывание" относится к связыванию, избирательному в отношении антигена, которое можно отличить от неспецифического связывания с нецелевым антигеном. Антигенсвязывающая молекула, которая специфически связывается с целевой молекулой, предпочтительно связывает указанную мишень с большей аффинностью и/или с большей продолжительностью относительно связывания с другими, нецелевыми молекулами. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающие молекулы могут связываться с ИЛ-11 с большей аффинностью, чем с одним или более представителями семейства цитокинов ИЛ-6. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенсвязывающие молекулы могут связываться с ИЛ-11 с большей аффинностью, чем с одним или более из ИЛ-6, фактора ингибирования лейкоза (LIF), онкостатина М (OSM), кардиотрофина-1 (CT-1), цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) и кардиотрофин-подобного цитокина (CLC).

Согласно вариантам реализации ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов достигается путем разрушения опосредованной ИЛ-11 цис-передачи сигналов, но без разрушения опосредованной ИЛ-11 транс-передачи сигналов, например, ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов достигается путем ингибирования опосредованных gp130 цис-комплексов, задействующего мембраносвязанный ИЛ-11R α . Согласно вариантам реализации ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов достигается путем разрушения опосредованной ИЛ-11 транс-передачи сигналов, но без разрушения опосредованной ИЛ-11 цис-передачи сигналов, т.е. ингибирования опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов достигается путем ингибирования опосредованных gp130 комплексов транс-передачи сигналов, например, ИЛ-11, связанного с растворимым ИЛ-11R α , или ИЛ-6, связанного с растворимым ИЛ-6R. Согласно вариантам реализации ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов достигается путем разрушения опосредованной ИЛ-11 цис-передачи сигналов и опосредованной ИЛ-11 транс-передачи сигналов.

Способность определенного полипептида специфически связываться с определенной молекулой может быть определена путем анализа в соответствии со способами, известными в данной области техники, такими как ИФА ELISA, поверхностный плазмонный резонанс (ППР; см. например, Hearty et al., *Methods Mol Biol* (2012) 907:411-442), биослойная интерферометрия (см., например, Lad et al., (2015) *J Biomol Screen* 20(4):498-507), проточная цитометрия, или с применением твердофазного иммуноферментного анализа связывания антигена, меченого радиоактивной меткой (RIA). Путем такого анализа может быть измерено и количественно определено связывание с определенной молекулой. Согласно некоторым вариантам реализации указанное связывание может представлять собой ответ, детектируемый в определенном анализе.

Согласно некоторым вариантам реализации степень связывания антигенсвязывающей молекулы с нецелевой молекулой составляет менее чем приблизительно 10% от связывания указанного антитела с целевой молекулой по оценке, например, с применением ИФА ELISA, ППР, биослойной интерферометрии или RIA. Как вариант, специфичность связывания может быть выражена через аффинность связывания, когда антигенсвязывающая молекула связывается с ИЛ-11 с константой диссоциации (K_D), которая по меньшей мере на 0,1 порядка величины (т.е. в $0,1 \times 10^n$, где n представляет собой целое число, соответствующее порядку величины) больше K_D антигенсвязывающей молекулы в отношении нецелевой молекулы. Указанное значение может необязательно соответствовать чему-либо одному из 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.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула демонстрирует связывание с ИЛ-11 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула демонстрирует связывание с ИЛ-11 мыши. Согласно некоторым вариантам реализации

указанная антигенсвязывающая молекула демонстрирует связывание с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна к перекрестной реактивности в отношении ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению демонстрирует перекрестную реактивность в отношении ИЛ-11 не являющегося человеком примата.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением связывается с ИЛ-11 с K_D 5 мкМ или менее, предпочтительно либо ≤ 1 мкМ, либо ≤ 500 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 75 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 40 нМ, ≤ 30 нМ, ≤ 20 нМ, ≤ 15 нМ, ≤ 12.5 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 9 нМ, ≤ 8 нМ, ≤ 7 нМ, ≤ 6 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 500 пМ.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением связывается с ИЛ-11 с аффинностью связывания (например, по оценке в ИФА ELISA) $EC_{50} = 1000$ нг/мл или менее, предпочтительно либо ≤ 900 нг/мл, либо ≤ 800 нг/мл, ≤ 700 нг/мл, ≤ 600 нг/мл, ≤ 500 нг/мл, ≤ 400 нг/мл, ≤ 300 нг/мл, ≤ 200 нг/мл, ≤ 100 нг/мл, ≤ 90 нг/мл, ≤ 80 нг/мл, ≤ 70 нг/мл, ≤ 60 нг/мл, ≤ 50 нг/мл, ≤ 40 нг/мл, ≤ 30 нг/мл, ≤ 20 нг/мл, ≤ 15 нг/мл, ≤ 10 нг/мл, $\leq 7,5$ нг/мл, ≤ 5 нг/мл, $\leq 2,5$ нг/мл, либо ≤ 1 нг/мл.

Аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 может быть проанализирована *in vitro* с применением ИФА ELISA. Подходящие анализы хорошо известны в данной области техники и могут быть выполнены специалистом в данной области техники, например, согласно описанию в источнике: *Antibody Engineering*, vol. 1 (2nd Edn), Springer Protocols, Springer (2010), Part V, pp657-665. Например, аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 может быть проанализирована в соответствии с методологией, описанные в настоящем документе, в экспериментальных примерах.

Способность антигенсвязывающей молекулы ингибировать взаимодействие между двумя белками может быть определено, например, путем анализа взаимодействия в присутствии антигенсвязывающей молекулы или после инкубации одного или обоих партнеров для взаимодействия с антигенсвязывающей молекулой. Примером подходящего анализа для определения способности определенной антигенсвязывающей молекулы ингибировать взаимодействие между двумя партнерами для взаимодействия является конкурентный ИФА-анализ ELISA.

Антигенсвязывающую молекулу, которая способна ингибировать определенное взаимодействие (например, между ИЛ-11 и ИЛ-11R α , или между ИЛ-11 и gp130, или между ИЛ-11 и ИЛ-11R α :gp130, или между ИЛ-11:ИЛ-11R α и gp130) идентифицируют по наблюдению снижения/уменьшения уровня взаимодействия между партнерами для взаимодействия в присутствии указанной антигенсвязывающей молекулы - или после инкубации одного или обоих партнеров для взаимодействия с указанной антигенсвязывающей молекулой - по сравнению с уровнем взаимодействия в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Подходящий анализ может быть выполнен *in vitro*, например, с применением рекомбинантных партнеров для взаимодействия или с применением клеток, экспрессирующих указанные партнеры для взаимодействия. Клетки, экспрессирующие партнеры для взаимодействия, могут осуществлять эту экспрессию эндогенным образом, или могут осуществлять экспрессию с нуклеиновой кислоты, введенной в клетку. Для проведения таких анализов один или оба партнера для взаимодействия и/или антигенсвязывающая молекула могут быть помечены или использованы в сочетании с детектируемым объектом для обнаружения и/или измерения уровня взаимодействия.

Способность антигенсвязывающей молекулы ингибировать взаимодействие между двумя партнерами для связывания может также быть определена путем анализа последующих функциональных последствий такого взаимодействия, например, рецепторной передачи сигналов. Например, последующие функциональные последствия взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11R α :gp130 или между ИЛ-11:ИЛ-11R α и gp130 может включать пролиферацию фибробластов, образование миофибробластов из фибробластов или экспрессию гена или белка чего-либо одного или более из коллагена, фибронектина, периостина, ИЛ-6, ИЛ-11, α SMA, TIMP1, MMP2.

Фибробласты в соответствии с настоящим изобретением могут происходить из любой ткани, в том числе печени, легких, почки, сердца, кровеносных сосудов, глаза, кожи, поджелудочной железы, селезенки, кишечника (например, толстого или тонкого кишечника), головного мозга и костного мозга. Согласно конкретным вариантам реализации фибробласты для анализа антигенсвязывающей молекулы могут представлять собой фибробласты сердца (например, фибробласты предсердий), фибробласты кожи, фибробласты легкого, фибробласты почки или фибробласты печени. Фибробласты могут быть охарактеризованы по экспрессии гена или белка чего-либо одного или более из COL1A, ACTA2, пролил-4-гидроксилазы, MAS516 и FSP1.

Генная экспрессия может быть измерена различными способами, известными специалистам в данной области техники, например, путем измерения уровней мРНК с применением количественной ПЦР в реальном времени (кРВ-ПЦР) или способов на основе репортеров. Аналогичным образом, экспрессию белка можно измерить различными способами, хорошо известными в данной области техники, например, способами на основе антител, например, с применением вестерн-блоттинга, иммуногистохимических

исследований, иммуноцитохимии, проточной цитометрии, ИФА ELISA, ELISPOT или способов на основе репортеров.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением может ингибировать экспрессию белка какого-либо одного или более из маркеров фиброза, например, экспрессию белка чего-либо одного или более из коллагена, фибронектина, пептидина, ИЛ-6, ИЛ-11, α SMA, TIMP1, MMP2.

Способность антигенсвязывающей молекулы ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и ИЛ-11R α :gp130 можно, например, проанализировать путем стимуляции фибробластов с использованием ТФР- β 1, инкубации клеток в присутствии антигенсвязывающей молекулы и анализа доли клеток с α SMA-положительным фенотипом по истечении заданного периода времени. В таком примере ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11R α :gp130 может быть идентифицировано по меньшей наблюдаемой доле клеток с α SMA-положительным фенотипом по сравнению с положительными контрольными условиями, когда клетки обрабатывают ТФР- β 1 в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы), или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы.

Такие анализы также подходят для анализа способности антигенсвязывающей молекулы для ингибирования опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и ИЛ-11R α до уровня, составляющего менее 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% или менее от уровня взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11R α в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и ИЛ-11R α до менее чем 1-кратного уровня, например, либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11R α в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и gp130 до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня взаимодействия между ИЛ-11 и gp130 в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и gp130 до менее чем 1-кратного уровня, например, либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня взаимодействия между ИЛ-11 и gp130 в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и ИЛ-11R α :gp130 до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11R α :gp130 в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и ИЛ-11R α :gp130 до менее чем 1-кратного уровня, например, либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11R α :gp130 в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей кон-

трольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать взаимодействие между комплексом ИЛ-11:ИЛ-11R α и gp130 до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня взаимодействия между комплексом ИЛ-11:ИЛ-11R α и gp130 в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать взаимодействие между комплексом ИЛ-11:ИЛ-11R α и gp130 до менее чем 1-кратного уровня, например, либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня взаимодействия между комплексом ИЛ-11:ИЛ-11R α и gp130 в отсутствие антигенсвязывающей молекулы.

Ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов могут также быть проанализированы с применением анализов с включением ^3H -тимидина и/или пролиферации клеток Ва/F3, таких как описанные, например, в источниках: Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) и Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80. Клетки Ва/F3 коэкспрессируют ИЛ-11R α и gp130.

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

Согласно некоторым вариантам реализации антитела и фрагменты в соответствии с настоящим изобретением способны ингибировать биологическую активность ИЛ-11 или содержащего ИЛ-11 комплекса. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула связывается с ИЛ-11 или содержащим ИЛ-11 комплексом в области, важной для связывания с рецептором ИЛ-11 или содержащего ИЛ-11 комплекса, например gp130 или ИЛ-11R α , и таким образом разрушает связывание и/или передачу сигналов через указанный рецептор.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антагонист одного или более путей передачи сигналов, которые активируются трансдукцией сигнала через рецепторы, содержащие ИЛ-11R α и/или gp130, например ИЛ-11R α :gp130. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать передачу сигналов через один или более иммунорецепторных комплексов, содержащих ИЛ-11R α и/или gp130, например ИЛ-11R α :gp130.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня передачи сигналов в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов до менее чем 1-кратного уровня, например, либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня передачи сигналов в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, может представлять собой передачу сигналов, опосредованную связыванием ИЛ-11 с рецептором ИЛ-11R α :gp130. Такая передача сигналов может быть проанализирована, например, путем обработки клеток, экспрессирующих ИЛ-11R α и gp130, ИЛ-11, или путем стимуляции продуцирования ИЛ-11 в клетках, которые экспрессируют ИЛ-11R α и gp130.

IC₅₀ антигенсвязывающей молекулы для ингибирования опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов может быть определена, например, путем культивирования клеток Ва/F3, экспрессирующих ИЛ-11R α и gp130, в присутствии ИЛ-11 человека и связывающего ИЛ-11 агента, и измерения включения ^3H -тимидина в ДНК.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению может демонстрировать IC₅₀ 10 мкг/мл или менее, предпочтительно либо ≤ 5 мкг/мл, либо ≤ 4 мкг/мл, ≤ 3,5 мкг/мл, ≤ 3 мкг/мл, ≤ 2 мкг/мл, ≤ 1 мкг/мл, ≤ 0,9 мкг/мл, ≤ 0,8 мкг/мл, ≤ 0,7 мкг/мл, ≤ 0,6 мкг/мл, или ≤ 0,5 мкг/мл в таком анализе.

Согласно некоторым вариантам реализации передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, может представлять собой передачу сигналов, опосредованную связыванием комплекса ИЛ-11:ИЛ-11Rα с gp130. Согласно некоторым вариантам реализации указанный комплекс ИЛ-11:ИЛ-11Rα может быть растворимым, например комплекс внеклеточного домена ИЛ-11Rα и ИЛ-11, или комплекс растворимой изоформы/фрагмента ИЛ-11Rα и ИЛ-11. Согласно некоторым вариантам реализации указанный растворимый ИЛ-11Rα представляет собой растворимую (секретируемую) изоформу ИЛ-11Rα, или высвобождаемый продукт протеолитического расщепления внеклеточного домена связанного с мембраной клеток ИЛ-11Rα. Передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, которая опосредована связыванием ИЛ-11, связанного с ИЛ-11Rα, с gp130, называется в настоящем документе "транс-передачей сигналов ИЛ-11".

Согласно некоторым вариантам реализации указанный комплекс ИЛ-11:ИЛ-11Rα может быть клеточно-связанным, например, комплекс связанного с мембраной клеток ИЛ-11Rα и ИЛ-11. Передача сигналов, опосредованная связыванием комплекса ИЛ-11:ИЛ-11Rα с gp130 может быть проанализировано путем обработки клеток, экспрессирующих gp130, комплексом ИЛ-11:ИЛ-11Rα, например рекомбинантным слитым белком, содержащим ИЛ-11, соединенным пептидным линкером с внеклеточным доменом ИЛ-11Rα (например, гипер-ИЛ-11 согласно описанию в настоящем документе).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать передачу сигналов, опосредованную связыванием комплекса ИЛ-11:ИЛ-11Rα с gp130, и также способна ингибировать передачу сигналов, опосредованную связыванием ИЛ-11 с рецептором ИЛ-11Rα:gp130.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и ИЛ-11 до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии подходящего контрольного антигенсвязывающего агента). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий агент способен ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 и ИЛ-11 до менее чем 1-кратного уровня, например, либо ≤ 0,99-кратно, либо ≤ 0,95-кратно, ≤ 0,9-кратно, ≤ 0,85-кратно, ≤ 0,8-кратно, ≤ 0,75-кратно, ≤ 0,7-кратно, ≤ 0,65-кратно, ≤ 0,6-кратно, ≤ 0,55-кратно, ≤ 0,5-кратно, ≤ 0,45-кратно, ≤ 0,4-кратно, ≤ 0,35-кратно, ≤ 0,3-кратно, ≤ 0,25-кратно, ≤ 0,2-кратно, ≤ 0,15-кратно, ≤ 0,1-кратно относительно уровня взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11 в отсутствие связывающего агента.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать пролиферацию фибробластов. Пролиферация фибробластов может быть определена путем анализа деления клеток на протяжении периода времени. Деление клеток в определенной популяции фибробластов может быть проанализировано, например, путем *in vitro* анализа включения ³H-тимидина или анализа разведения CFSE, например, согласно описанию в источнике: Fulcher and Wong, *Immunol Cell Biol* (1999) 77(6):559-564, полностью включенное в настоящий документ посредством ссылки. Пролиферирующие клетки (например, пролиферирующие фибробласты) могут также быть идентифицированы путем анализа включения 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) в подходящем анализе, согласно описанию, например, в источниках: Buck et al., *Biotechniques*. 2008 Jun; 44(7):927-9 и Sali and Mitchison, *PNAS USA* 2008 Feb 19; 105(7): 2415-2420, оба из которых включены в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Фибробласты в соответствии с настоящим изобретением могут происходить из любой ткани, в том числе печени, легких, почки, сердца, кровеносных сосудов, глаза, кожи, поджелудочной железы, селезенки, кишечника (например, толстого или тонкого кишечника), головного мозга и костного мозга. Согласно конкретным вариантам реализации фибробласты для анализа антигенсвязывающей молекулы могут представлять собой фибробласты сердца (например, фибробласты предсердий), фибробласты кожи, фибробласты легкого, фибробласты почки или фибробласты печени.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать пролиферацию фибробластов до уровня, составляющего менее 100%, например либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня пролиферации фибробластов в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

вающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать пролиферацию фибробластов до менее чем 1-кратного уровня, например, либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня пролиферации фибробластов в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать патологический процесс, опосредованный ИЛ-11, например, после стимуляции профибротическим фактором (например, ТФР- $\beta 1$). Патологические процессы, опосредованные ИЛ-11, включают фиброз, и могут быть оценены *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать фиброз. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна обеспечивать обращение или регресс фиброза. Согласно некоторым вариантам реализации указанный фиброз представляет собой сформировавшийся или тяжелый фиброз. Ингибирование фиброза в настоящем документе относится к способности антигенсвязывающей молекулы снижать, ограничивать или предотвращать развитие фиброза. Согласно некоторым вариантам реализации ингибирование фиброза относится, например, к профилактическому эффекту, за счет которого происходит предотвращение развития фиброза. Согласно некоторым вариантам реализации ингибирование фиброза относится, например, к эффекту лечения, за счет которого происходит предотвращение развития или прогрессирования до более продвинутой стадии существующего фиброза на ранней или поздней стадии. Обращение или регресс фиброза в настоящем документе относится к способности антигенсвязывающей молекулы смягчать фибротическое состояние с переходом от более продвинутого состояния к менее продвинутому состоянию, или облегчать тяжесть собственно фиброза или его симптомов. Обращение фиброза может быть ассоциировано с улучшением фибротического состояния.

В экспериментальных примерах в настоящем документе ингибирование, обращение или регресс фиброза анализируют, например, путем измерения количества или процента клеток АСТА2⁺ с применением системы многопараметрической визуализации Operetta, измерения уровня коллагена в клетках или органах путем оценки содержания гидроксипролина, измерения активации/фосфорилирования ERK с применением вестерн-блоттинга, и/или измерения уровня экспрессии маркеров воспаления, таких как ФНО- α и CCL2, или фибротических маркеров, таких как ТФР- $\beta 1$, α SMA (АСТА2), TIMP1, COL1A1, COL1A2 или COL3A1, с применением количественной ПЦР. В таких тканях, как печень, ингибирование, обращение или регресс фиброза анализируют, например, путем определения содержания триглицеридов и уровней АЛТ в сыворотке.

Фиброз может поражать конкретную ткань или несколько тканей, например, печень, легкое, почку, сердце, кровеносный сосуд, глаз, кожу, поджелудочную железу, селезенку, кишечник (например, толстый или тонкий кишечник), головной мозг или костный мозг. Фиброз может быть измерен хорошо известными специалисту способами, например, путем анализа экспрессии гена или белка одного или более маркеров миофибробластов и/или экспрессии гена или белка одного или более маркеров фиброза в определенной ткани или тканях.

Маркеры миофибробластов могут включать что-либо одно или более из повышенных уровней α SMA, виментина, палладина, кофилина или десмина. Маркеры фиброза включают повышенный уровень коллагена, фибронектина, периостина, ИЛ-6, ИЛ-11, α SMA, TIMP1 и MMP2, компонентов внеклеточного матрикса, количество/долю миофибробластов, а также массу органа.

Ингибирование/обращение/регресс фиброза может быть измерено *in vitro* или *in vivo*. Например, анализ способности антигенсвязывающей молекулы способна ингибировать/обращать/обеспечивать регресс фиброза в определенной ткани может быть проведен *in vitro* путем обработки фибробластов, происходящих из указанной ткани, профибротическим стимулом и последующего анализа способности указанного антитела уменьшать или обращать образование миофибробластов из фибробластов (или, например, какого-то другого маркера фиброза). Анализ способности антигенсвязывающей молекулы ингибировать/обращать/обеспечивать регресс фиброза может быть проведен *in vivo*, например, путем введения указанной антигенсвязывающей молекулы субъекту (например, субъекту, на которого воздействовал профибротический стимул) и анализа ткани (тканей) на один или более маркеров фиброза.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать/обращать/обеспечивать регресс фиброза до уровня, составляющего менее 100%, например либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня фиброза в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей мо-

лекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать/обращать/обеспечивать регресс фиброза до менее чем 1-кратного уровня, например, либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня фиброза в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать образование миофибробластов из фибробластов или звездчатых клеток (например, звездчатых клеток печени или поджелудочной железы), например, после воздействия на фибробласты или звездчатые клетки профибротическим фактором. Образование миофибробластов из фибробластов или звездчатых клеток может быть исследовано путем анализа на маркеры миофибробластов. Профибротический фактор в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой, например, ТФР- $\beta 1$, ИЛ-11, ИЛ-13, ТРФ, ЕТ-1, онкостатин М (OSM) или ANG2 (AngII). Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать активацию фибробластов или звездчатых клеток профибротическим фактором.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна стимулировать старение звездчатых клеток. Старение может быть измерено путем обнаружения экспрессии маркеров старения, таких как P16, P21 и P53.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать экспрессию в фибробластах, звездчатых клетках или клетках, происходящих из фибробластов/звездчатых клеток (например, миофибробластах) одного или более генов или белков из коллагена, фибронектина, периостина, ИЛ-6, ИЛ-11, α SMA, TIMP1, MMP2, ФНО- α , CCL2, например, после стимуляции профибротическим фактором. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать в фибробластах или происходящих из фибробластов клетках (например, миофибробластах) экспрессию гена или белка одного или более компонентов внеклеточного матрикса, например, после стимуляции профибротическим фактором.

В экспериментальных примерах в настоящем документе анализируют образование миофибробластов из фибробластов или звездчатых клеток путем измерения уровни экспрессии белка α SMA с применением системы многопараметрической визуализации Operetta после стимуляции фибробластов ТФР- $\beta 1$.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать образование миофибробластов из фибробластов или звездчатых клеток до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня образования миофибробластов из фибробластов или звездчатых клеток в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать образование миофибробластов из фибробластов или звездчатых клеток до менее чем 1-кратного уровня, например либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня образования миофибробластов из фибробластов или звездчатых клеток в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать в фибробластах, звездчатых клетках или миофибробластах экспрессию гена или белка чего-либо одного или более из: коллагена, фибронектина, периостина, ИЛ-6, ИЛ-11, α SMA, TIMP1, MMP2, ФНО- α , CCL2, например, после стимуляции профибротическим фактором (например, ТФР- $\beta 1$). Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать экспрессию гена или белка до уровня, составляющего менее 100%, например либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня экспрессии гена или белка в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать экспрессию гена или белка до менее чем 1-кратного уровня, например либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -

кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня экспрессии гена или белка в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать продуцирование внеклеточного матрикса фибробластами или звездчатыми клетками, например, после стимуляции профибротическим фактором (например, ТФР- $\beta 1$). Продуцирование внеклеточного матрикса может оцениваться, например, путем измерения уровня компонента внеклеточного матрикса. Компоненты внеклеточного матрикса в соответствии с настоящим изобретением включают, например, протеогликан, гепарансульфат, хондроитинсульфат, кератансульфат, гиалуроновую кислоту, коллаген, периостин, фибронектин, витронектин, эластин, фибронектин, ламинин, нидоген, желатин и агрекан. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать секрецию коллагена фибробластами, звездчатыми клетками и/или миофибробластами.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать продуцирование внеклеточного матрикса фибробластами или звездчатыми клетками до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня продуцирования внеклеточного матрикса фибробластами или звездчатыми клетками в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать продуцирование внеклеточного матрикса фибробластами или звездчатыми клетками до менее чем 1-кратного уровня, например либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня продуцирования внеклеточного матрикса в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна повышающе регулировать экспрессию в клетках печени одного или более генов/белков, вовлеченных в липогенез и/или β -окисление. Такие гены/белки могут представлять собой, например, ACOX1 (ацил-КоА-оксидазу 1), SCD1 (стеарил-КоА-десатуразу 1), FASN (синтазу жирных кислот) или SREBF1 (связывающий регуляторный элемент стерола белок 1). Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна повышающе регулировать экспрессию гена или белка до уровня более чем в 1 раз, например либо в $\geq 1,01$ раз, либо в $\geq 1,05$ раз, $\geq 1,1$ раз, $\geq 1,15$ раз, $\geq 1,2$ раз, $\geq 1,25$ раз, $\geq 1,3$ раз, $\geq 1,35$ раз, $\geq 1,4$ раз, $\geq 1,45$ раз, $\geq 1,5$ раз, $\geq 1,55$ раз, $\geq 1,6$ раз, $\geq 1,65$ раз, $\geq 1,7$ раз, $\geq 1,75$ раз, $\geq 1,8$ раз, $\geq 1,85$ раз, $\geq 1,9$ раз, $\geq 1,95$ раз, ≥ 2 раз, $\geq 2,5$ раз, ≥ 3 раз, $\geq 3,5$ раз, ≥ 4 раз, $\geq 4,5$ раз, ≥ 5 раз, ≥ 6 раз, ≥ 7 раз, ≥ 8 раз, ≥ 9 раз или ≥ 10 раз выше уровня экспрессии гена или белка в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать миграционное и/или инвазивное поведение, т.е. ингибировать миграцию и/или инвазию фибробластов, звездчатых клеток или миофибробластов. Миграция и инвазия таких клеток могут иметь важнейшее значение для патологии фиброза. Миграция клеток может оцениваться с применением например, поликарбонатных мембран и стимуляторов инвазии, таких как ТФР- $\beta 1$ или CCL2. Инвазия клеток может быть измерена с применением, например, анализов инвазии в камере Бойдена или в матригеле с покрытием ВКМ. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать миграцию и/или инвазию фибробластов, звездчатых клеток или миофибробластов до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня миграции и/или инвазии в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать миграцию и/или инвазию до менее чем 1-кратного уровня, например либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня миграции и/или инвазии в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать присутствие иммунных клеток в органе. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна уменьшать количество иммунных клеток в органе. Указанный орган может представлять собой орган, подверженный фиброзу или пораженный фиброзом, например, печень или почку. Указанные иммунные клетки могут представлять собой CD45⁺ клетки, например, CD3⁺CD4⁺ Т-клетки, CD3⁺CD8⁺ Т-клетки, В-лимфоциты, гранулоциты и моноциты. Указанные иммунные клетки могут экспрессировать маркер LyC6 моноцитов мыши. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна уменьшать количество иммунных клеток в органе до уровня, составляющего менее 100%, например либо 99% или менее, либо 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% или менее от количества иммунных клеток в органе в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать количество иммунных клеток в органе до менее чем 1-кратного, например либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно количества иммунных клеток в органе в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать пролиферацию и/или выживание клеток рака. Специалист в данной области техники способен определить, способна ли антигенсвязывающая молекула ингибировать пролиферацию и/или выживание клеток рака, например, путем анализа эффекта антигенсвязывающей молекулы на клетки рака. Например, пролиферация клеток может быть измерена согласно описанию в настоящем документе, например, путем анализа с включением ³Н-тимидина или анализа разведения CFSE. Выживание клеток может быть проанализировано путем измерения в клетках маркеров жизнеспособности клеток/смерти клеток после обработки указанной антигенсвязывающей молекулой.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать пролиферацию и/или выживание клеток рака до уровня, составляющего менее 100%, например, либо 99% или менее, либо 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% или менее от уровня пролиферации и/или выживания клеток рака в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать пролиферацию и/или выживание клеток рака до менее чем 1-кратного уровня, например либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно относительно уровня пролиферации и/или выживания клеток рака в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению ингибирует развитие и/или прогрессирование рака *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула вызывает киллинг раковых клеток, например, эффекторными иммунными клетками. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула вызывает снижение количества раковых клеток *in vivo*, например, по сравнению с подходящими контрольными условиями. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула ингибирует рост опухоли, например, исходя из определенного размера /объема опухоли на протяжении периода времени.

Антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению может быть проанализирована на способность ингибировать развитие и/или прогрессирование рака в подходящей модели *in vivo*. Указанный рак может представлять собой рак, в который патологическим образом вовлечены передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, и/или клетки, экспрессирующие/содержащие ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11. Такие виды рака включают описанные в источниках: Xu et al., *Cancer Lett.* (2016) 373(2): 156-63 и Johnstone et al., *Cytokine & Growth Reviews* (2015) 26(5): 489-498, оба из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

Согласно некоторым вариантам реализации введение антигенсвязывающей молекулы в соответствии с настоящим изобретением может вызывать что-либо одно или более из ингибирования развития/прогрессирования рака, задержки/предотвращения начала рака, снижения/задержки/предотвращения

роста опухоли, снижения/задержки/предотвращения метастазирования, снижения тяжести симптомов рака, снижения количества раковых клеток, снижения размера/объема опухолей и/или повышения выживаемости (например, выживаемости без прогрессирования), например, по оценке в подходящей модели рака *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает аддитивный эффект при совместном введении, например, раздельно, одновременно или последовательно, с химиотерапевтическим агентом, по сравнению с введением одного химиотерапевтического агента. Аддитивный эффект может представлять собой любой эффект, описанный в настоящем документе, такой как снижение передачи сигналов ИЛ-11, ингибирование развития/прогрессирования рака и/или ингибирование роста опухоли.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением способна ингибировать рост опухоли до уровня менее 100%, например один из 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% или менее от уровня роста опухоли в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы). Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенсвязывающая молекула способна уменьшать рост опухоли менее чем в 1 раз, например либо $\leq 0,99$ -кратно, либо $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ раз относительно уровня роста опухоли в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению способна вызывать киллинг клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11. Киллинг клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, может быть увеличен за счет эффекторной функции антигенсвязывающей молекулы. Согласно вариантам реализации, отличающимся тем, что антигенсвязывающая молекула содержит Fc-область, указанная антигенсвязывающая молекула может вызывать киллинг клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, посредством чего-либо из комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ), антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ).

Антигенсвязывающая молекула, способная вызывать киллинг клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, может быть идентифицирована путем наблюдения за изменением уровня киллинга клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, в присутствии антигенсвязывающей молекулы или после инкубации клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11, с антигенсвязывающей молекулой, относительно уровня киллинга клеток, детектируемого в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы) в подходящем анализе. Анализ КЗЦ, АЗКЦ и АЗКФ хорошо известны специалисту. Уровень киллинга клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, может также быть определен путем измерения количества/пропорции жизнеспособных и/или нежизнеспособных клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, после воздействия разными условиями обработки.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению способна вызывать киллинг клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, на уровне более чем в 1 раз, например $\geq 1,01$ раз, $\geq 1,02$ раз, $\geq 1,03$ раз, $\geq 1,04$ раз, $\geq 1,05$ раз, $\geq 1,1$ раз, $\geq 1,2$ раз, $\geq 1,3$ раз, $\geq 1,4$ раз, $\geq 1,5$ раз, $\geq 1,6$ раз, $\geq 1,7$ раз, $\geq 1,8$ раз, $\geq 1,9$ раз, ≥ 2 раз, ≥ 3 раз, ≥ 4 раз, ≥ 5 раз, ≥ 6 раз, ≥ 7 раз, ≥ 8 раз, ≥ 9 раз или ≥ 10 раз выше уровня киллинга, наблюдаемого в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению способна уменьшать количество клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, менее чем в 1 раз, например в $\leq 0,99$ -кратно, $\leq 0,95$ -кратно, $\leq 0,9$ -кратно, $\leq 0,85$ -кратно, $\leq 0,8$ -кратно, $\leq 0,75$ -кратно, $\leq 0,7$ -кратно, $\leq 0,65$ -кратно, $\leq 0,6$ -кратно, $\leq 0,55$ -кратно, $\leq 0,5$ -кратно, $\leq 0,45$ -кратно, $\leq 0,4$ -кратно, $\leq 0,35$ -кратно, $\leq 0,3$ -кратно, $\leq 0,25$ -кратно, $\leq 0,2$ -кратно, $\leq 0,15$ -кратно, $\leq 0,1$ -кратно, $\leq 0,05$ раз или $\leq 0,01$ раз относительно числа клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, детектируемых после инкубации в отсутствие антигенсвязывающей молекулы (или после инкубации в присутствии подходящей контрольной антигенсвязывающей молекулы) в сопоставимом анализе. Количества клеток и их пропорции могут быть определены, например, с помощью проточно-цитометрического анализа с применением антител, позволяющих детектировать типы клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула в соответствии с настоящим изобретением характеризуется одним или более аналогичными или улучшенными свойствами относительно референсного антитела/ его антигенсвязывающего фрагмента, способного к связыванию с ИЛ-11.

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению проявляет одно или более из следующих свойств относительно референсного антитела/ его антигенсвязывающего фрагмента, способного к связыванию с ИЛ-11:

(i) связывается с ИЛ-11 с аналогичной или большей специфичностью (т.е. характеризуется аналогичной или пониженной перекрестной реактивностью в отношении белков семейства цитокинов ИЛ-6, не являющихся ИЛ-11);

(ii) связывается с ИЛ-11 (например, ИЛ-11 человека и/или ИЛ-11 мыши) с аналогичной или большей аффинностью (например, характеризуется аналогичной или меньшей EC50 по оценке в ИФА ELISA; например, характеризуется аналогичной или меньшей K_D по оценке в НИР-анализе);

(iii) аналогичное или большее ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11R α ;

(iv) аналогичное или большее ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и gp130;

(v) аналогичное или большее ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и рецепторным комплексом ИЛ-11R α :gp130;

(vi) аналогичное или большее ингибирование взаимодействия между комплексом ИЛ-11:ИЛ-11R α и gp130;

(vii) аналогичное или большее ингибирование взаимодействия между ИЛ-11 и ИЛ-11;

(viii) аналогичное или большее ингибирование передачи сигналов, опосредованной ИЛ-11 (например, характеризуется аналогичной или меньшей IC50 по результатам ИФА ELISA в подходящем анализе);

(ix) аналогичное или большее ингибирование передачи сигналов, опосредованной связыванием ИЛ-11 с рецепторным комплексом ИЛ-11R α :gp130;

(x) аналогичное или большее ингибирование передачи сигналов, опосредованной связыванием комплекса ИЛ-11:ИЛ-11R α с gp130 (т.е. транс-передачи сигналов ИЛ-11);

(xi) аналогичное или большее ингибирование пролиферации фибробластов;

(xii) аналогичное или большее ингибирование образования миофибробластов из фибробластов;

(xiii) аналогичное или большее ингибирование обращения/регресса образования миофибробластов из фибробластов;

(xiv) аналогичное или большее ингибирование образования миофибробластов из звездчатых клеток, например, звездчатых клеток печени или поджелудочной железы;

(xv) аналогичное или большее обращение/регресс образования миофибробластов из звездчатых клеток, например, звездчатых клеток печени или поджелудочной железы;

(xvi) аналогичное или большее ингибирование миграционного и/или инвазивного поведения (т.е. ингибирование миграции и/или инвазии) фибробластов, звездчатых клеток или миофибробластов;

(xvii) аналогичное или большее ингибирование присутствия иммунных клеток в органе;

(xviii) аналогичное или большее ингибирование патологического процесса, опосредованного ИЛ-11;

(xix) аналогичное или большее ингибирование фиброза; (xx) аналогичное или большее обращение/регресс фиброза;

(xxi) аналогичное или большее ингибирование экспрессии в фибробластах гена или белка чего-либо одного или более из коллагена, фибронектина, периостина, ИЛ-6, ИЛ-11, α SMA (ACTA2), TIMP1, MMP2, ФНО- α , CCL2, например, после стимуляции профибротическим фактором; (xxii) аналогичное или большее ингибирование продуцирования внеклеточного матрикса фибробластами или звездчатыми клетками;

(xxiii) аналогичное или большее ингибирование пролиферации и/или выживания клеток рака; (xxiv) аналогичное или большее ингибирование развития и/или прогрессирувания рака in vivo; (xxv) аналогичное или большее ингибирование роста опухоли;

(xxvi) аналогичный или больший киллинг клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11.

Согласно некоторым вариантам реализации "большая специфичность", или "большая аффинность", или "большее ингибирование", или "большой киллинг" относится, соответственно, к уровню специфичности, аффинности, ингибирования или киллинга, более чем в 1 раз, например $\geq 1,01$ раз, $\geq 1,02$ раз, $\geq 1,03$ раз, $\geq 1,04$ раз, $\geq 1,05$ раз, $\geq 1,06$ раз, $\geq 1,07$ раз, $\geq 1,08$ раз, $\geq 1,09$ раз, $\geq 1,1$ раз, $\geq 1,2$ раз, $\geq 1,3$ раз, $\geq 1,4$ раз, $\geq 1,5$ раз, $\geq 1,6$ раз, $\geq 1,7$ раз, $\geq 1,8$ раз, $\geq 1,9$ раз, ≥ 2 раз, $\geq 2,1$ раз, $\geq 2,2$ раз, $\geq 2,3$ раз, $\geq 2,4$ раз, $\geq 2,5$ раз, $\geq 2,6$ раз, $\geq 2,7$ раз, $\geq 2,8$ раз, $\geq 2,9$ раз, ≥ 3 раз, $\geq 3,5$ раз, ≥ 4 раз, $\geq 4,5$ раз, ≥ 5 раз, ≥ 6 раз, ≥ 7 раз, ≥ 8 раз, ≥ 9 раз, ≥ 10 раз, ≥ 15 раз, ≥ 20 раз, ≥ 25 раз, ≥ 30 раз, ≥ 35 раз, ≥ 40 раз, ≥ 45 раз, ≥ 50 раз, ≥ 60 раз, ≥ 70 раз, ≥ 80 раз, ≥ 90 раз, ≥ 100 раз, ≥ 200 раз, ≥ 300 раз, ≥ 400 раз, ≥ 500 раз, ≥ 600 раз, ≥ 700 раз, ≥ 800 раз, ≥ 900 раз, ≥ 1000 раз выше уровня, наблюдаемого для референсного антитела/его антигенсвязывающего фрагмента, способного к

связыванию с ИЛ-11, как определено в подходящем анализе.

Согласно некоторым вариантам реализации "аналогичная специфичность", или "аналогичная аффинность", или "аналогичное ингибирование", или "аналогичный киллинг" относится, соответственно, к уровню специфичности, аффинности, ингибирования или киллинга, который $\geq 0,2$ раз и ≤ 5 раз, например $\geq 0,3$ раз и ≤ 4 раз, $\geq 0,4$ раз и ≤ 3 раз, $\geq 0,5$ раз и ≤ 2 раз, $\geq 0,6$ раз и $\leq 1,75$ раз, $\geq 0,7$ раз и $\leq 1,5$ раз, $\geq 0,75$ раз и $\leq 1,25$ раз, $\geq 0,8$ раз и $\leq 1,2$ раз, $\geq 0,85$ раз и $\leq 1,15$ раз, $\geq 0,9$ раз и $\leq 1,1$ раз, $\geq 0,91$ раз и $\leq 1,09$ раз, $\geq 0,92$ раз и $\leq 1,08$ раз, $\geq 0,93$ раз и $\leq 1,07$ раз, $\geq 0,94$ раз и $\leq 1,06$ раз, $\geq 0,95$ раз и $\leq 1,05$ раз, $\geq 0,96$ раз и $\leq 1,04$ раз, $\geq 0,97$ раз и $\leq 1,03$ раз, $\geq 0,98$ раз и $\leq 1,02$ раз или $\geq 0,99$ раз и $\leq 1,01$ раз отличается от уровня наблюдаемого для референсного антитела/его антигенсвязывающего фрагмента, способного к связыванию с ИЛ-11, как определено в подходящем анализе.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное референсное антитело/фрагмент антитела, способное(ый) к связыванию с ИЛ-11, может содержать области CDR клона антитела против ИЛ-11, выбранного из YU100-H01, YU100-G08 или YU100-F11. Согласно некоторым вариантам реализации указанное референсное антитело/фрагмент антитела, способное(ый) к связыванию с ИЛ-11, может содержать последовательности или состоять из последовательностей VH и VL клона антитела против ИЛ-11, выбранного из YU100-H01, YU100-G08 или YU100-F11.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное референсное антитело/фрагмент антитела, способное(ый) к связыванию с ИЛ-11, может содержать области CDR клона моноклонального антитела мыши против ИЛ-11 человека #22626; кат. № MAB218 (R&D Systems, Миннесота, США). Согласно некоторым вариантам реализации указанное референсное антитело/фрагмент антитела, способное(ый) к связыванию с ИЛ-11, может содержать последовательности или состоять из последовательностей VH и VL клона моноклонального антитела мыши против ИЛ-11 человека #22626; кат. № MAB218 (R&D Systems, Миннесота, США).

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

Согласно настоящему изобретению также предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающие молекулы или полипептиды согласно настоящему изобретению.

CAR представляют собой рекомбинантные рецепторы, которые обеспечивают и антигенсвязывающие, и активирующие T-клетки функций. Структура и конструирование CAR описаны, например, в источнике: Dotti et al., *Immunol Rev* (2014) 257(1), полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки. CAR содержат антигенсвязывающую область, соединенную с заякоривающей в клеточной мембране областью и сигнальной областью. Необязательная шарнирная область может обеспечивать разделение антигенсвязывающей области и заякоривающей в клеточной мембране области, и может функционировать в качестве гибкого линкера.

CAR согласно настоящему изобретению содержит антигенсвязывающую область, которая содержит антигенсвязывающую молекулу или состоит из антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению, или содержит полипептид или состоит из полипептида в соответствии с настоящим изобретением.

Заякоривающую в клеточной мембране область располагают между антигенсвязывающей областью и сигнальной областью CAR; она обеспечивает заякоривание указанного CAR на мембране клетки, экспрессирующей CAR, при этом антигенсвязывающая область находится во внеклеточном пространстве, а сигнальная область внутри клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный CAR содержит заякоривающую в клеточной мембране область, содержащую или состоящую из последовательности аминокислот, которая содержит последовательность аминокислот, состоит из или происходит из последовательности аминокислот трансмембранной области одного из CD3- ζ , CD4, CD8 или CD28. В настоящем документе область, которая "происходит" из референсной последовательности аминокислот, включает последовательность аминокислот, характеризующуюся по меньшей мере 60%, например по меньшей мере либо 65%, либо 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей указанной референсной последовательности.

Сигнальная область CAR позволяет обеспечить активацию T-клетки. Сигнальные области CAR могут содержать последовательность аминокислот внутриклеточного домена CD3- ζ , который обеспечивает иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM) для фосфорилирования и активации CAR-экспрессирующей T-клетки. В CAR использовались также и сигнальные области, содержащие последовательности других ITAM-содержащих белков, такие как Fc γ RI (Haynes et al., 2001 *J Immunol* 166(1):182-187). Сигнальные области CAR могут также содержать костимулирующие последовательности, происходящие из сигнальной области костимулирующих молекул, для облегчения активации CAR-экспрессирующих T-клеток при связывании с целевым белком. Подходящие костимулирующие молекулы включают CD28, OX40, 4-1BB, ICOS и CD27. В некоторых случаях CAR конструируют для обеспечения костимуляции разных путей внутриклеточной передачи сигналов. Например, передача сигналов, ассоциированная с костимуляцией CD28, преимущественно активирует путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), тогда как опосредованная 4-1BB передача сигналов передается через адапторные белки - ассоциированные с рецептором ФНО факторы (TRAF). Сигнальные области CAR, соответственно, ино-

гда содержат костимулирующие последовательности, происходящие из сигнальных областей более чем одной костимулирующей молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации CAR согласно настоящему изобретению содержит одну или более костимулирующих последовательностей, содержащих или состоящих из последовательности аминокислот, которая содержит последовательность аминокислот, состоит или происходит из последовательности аминокислот внутриклеточного домена чего-либо одного или более из CD28, OX40, 4-1BB, ICOS и CD27.

Необязательная шарнирная область может обеспечивать разделение антигенсвязывающего домена и трансмембранного домена, и может функционировать в качестве гибкого линкера. Шарнирные области могут происходить из IgG1. Согласно некоторым вариантам реализации CAR согласно настоящему изобретению содержит шарнирную область, содержащую последовательность аминокислот или состоящую из последовательности аминокислот, которая содержит последовательность аминокислот, состоит или происходит из последовательности аминокислот шарнирной области IgG1.

Также предложена клетка, содержащая CAR в соответствии с настоящим изобретением. CAR в соответствии с настоящим изобретением может применяться для получения CAR-экспрессирующих иммунных клеток, например, CAR-T- или CAR-NK-клеток. Конструирование иммунных клеток, содержащих CAR, может быть проведено в культуре, *in vitro*.

Антигенсвязывающая область CAR согласно настоящему изобретению может быть представлена в любом подходящем формате, например, scFv, scFab и т.п.

Нуклеиновые кислоты и векторы

Согласно настоящему изобретению предложена нуклеиновая кислота или совокупность нуклеиновых кислот, кодирующая антигенсвязывающую молекулу, полипептид или CAR в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно некоторым вариантам реализации указанную нуклеиновую кислоту очищают или выделяют, например, из другой нуклеиновой кислоты или из встречающегося в природе биологического материала. Согласно некоторым вариантам реализации указанная нуклеиновая кислота (кислоты) содержат или состоят из ДНК и/или РНК.

Согласно настоящему изобретению также предложен(ы) вектор или совокупность векторов, содержащих нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением.

Последовательность нуклеотидов может содержаться в векторе, например, экспрессионном векторе. "Вектор" в настоящем документе представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве основы для переноса экзогенной нуклеиновой кислоты в клетку. Указанный вектор может представлять собой вектор для экспрессии указанной нуклеиновой кислоты в клетке. Такие векторы могут включать последовательность промотора, функционально связанную с последовательностью нуклеотидов, кодирующей последовательность для экспрессии. Вектор может также включать терминирующий кодон и энхансеры экспрессии. Любые подходящие векторы, промоторы, энхансеры и терминирующие кодоны, известные в данной области техники, могут применяться для экспрессии пептида или полипептида с вектора в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "функционально связанный" может включать ситуацию, когда выбранная последовательность нуклеиновой кислоты и регуляторная последовательность нуклеиновой кислоты (например, промотор и/или энхансер) ковалентно связаны таким образом, чтобы обеспечить влияние или контроль экспрессии указанной последовательности нуклеиновой кислоты указанной регуляторной последовательностью (с образованием таким образом экспрессионной кассеты). Соответственно, регуляторная последовательность функционально связана с выбранной последовательностью нуклеиновой кислоты, если указанная регуляторная последовательность способна осуществлять транскрипцию указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Итоговый транскрипт (транскрипты) затем могут быть транслированы в требуемый пептид (пептиды)/полипептид (полипептиды).

Подходящие векторы включают плазмиды, бинарные векторы, ДНК-векторы, мРНК-векторы, вирусные векторы (например, гамма-ретровирусные векторы (например, происходящие из вируса лейкоза мыши (MLV) векторы), лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, векторы на основе вируса осповакцины и герпесвирусные векторы), векторы на основе транспозонов и искусственные хромосомы (например, дрожжевые искусственные хромосомы).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный вектор может представлять собой эукариотический вектор, например, вектор, содержащий элементы, необходимые для экспрессии белка с указанного вектора в эукариотической клетке. Согласно некоторым вариантам реализации указанный вектор может представлять собой вектор для млекопитающих, например, содержащий цитомегаловирус (CMV) или промотор SV40 для управления экспрессией белка.

Полипептиды - составляющие антигенсвязывающей молекулы в соответствии с настоящим изобретением могут быть закодированы разными нуклеиновыми кислотами из совокупности нуклеиновых кислот, или разными векторами из совокупности векторов.

Клетки, содержащие/экспрессирующие указанные антигенсвязывающие молекулы и полипептиды

Согласно настоящему изобретению также предложена клетка, содержащая или экспрессирующая

антигенсвязывающую молекулу, полипептид или CAR в соответствии с настоящим изобретением. Также предложена клетка, содержащая или экспрессирующая нуклеиновую кислоту, совокупность нуклеиновых кислот, вектор или совокупность векторов в соответствии с настоящим изобретением.

Указанная клетка может представлять собой эукариотическую клетку, например, клетку млекопитающего. Указанное млекопитающее может представлять собой примата (макака-резуса, яванского макака, не являющегося человеком примата или человека) или не являющееся человеком млекопитающее (например, кролика, морскую свинку, крысу, мышь или другого грызуна (в том числе любое животное отряда грызунов), кошку, собаку, свинью, овцу, козу, крупный рогатый скот (в том числе корову, например, молочную корову или любое животное рода *Bos*), лошадь (в том числе любое животное семейства лошадиных), осла и не являющегося человеком примата).

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения клетки, содержащей нуклеиновую кислоту (кислоты) или вектор (векторы) в соответствии с настоящим изобретением, включающий введение в клетку нуклеиновой кислоты, совокупности нуклеиновых кислот, вектора или совокупности векторов в соответствии с настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам реализации введение выделенной нуклеиновой кислоты (кислот) или выделенного вектора (векторов) в соответствии с настоящим изобретением в клетку включает трансформацию, трансфекцию, электропорацию или трансдукцию (например, ретровирусную трансдукцию).

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения клетки, экспрессирующей/содержащей антигенсвязывающую молекулу, полипептид или CAR в соответствии с настоящим изобретением, включающий введение в клетку нуклеиновой кислоты, совокупности нуклеиновых кислот, вектора или совокупности векторов в соответствии с настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы дополнительно включают культивирование указанной клетки в условиях, подходящих для экспрессии указанной нуклеиновой кислоты (кислот) или указанного вектора (векторов) указанной клеткой. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы осуществляют *in vitro*.

Согласно настоящему изобретению также предложены клетки, полученные или подходящие для получения с применением способов в соответствии с настоящим изобретением.

Получение антигенсвязывающих молекул и полипептидов

Антигенсвязывающие молекулы и полипептиды в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены в соответствии со способами получения полипептидов, известными специалисту в данной области техники.

Полипептиды могут быть получены с применением химического синтеза, например, жидкофазного или твердофазного синтеза. Например, пептиды/полипептиды могут быть синтезированы с применением способов, описанных, например, в источнике: Chandru et al., *Molecules* (2013), 18: 4373-4388, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Как вариант, антигенсвязывающие молекулы и полипептиды могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии. В данной области техники хорошо известны методики молекулярной биологии, подходящие для рекомбинантного получения полипептидов, такие как представленные в источниках: Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th Edition), Cold Spring Harbor Press, 2012; и *Nat Methods*. (2008); 5(2): 135-146, оба из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. Способы рекомбинантного получения антигенсвязывающих молекул также описаны в источниках: Frenzel et al., *Front Immunol.* (2013); 4: 217 и Kunert and Reinhart, *Appl Microbiol Biotechnol.* (2016) 100: 3451-3461, оба из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

В некоторых случаях антигенсвязывающая молекула согласно настоящему изобретению состоит более чем из одной полипептидной цепи. В таких случаях получение указанной антигенсвязывающей молекулы может включать транскрипцию и трансляцию более одного полипептида и последующее связывание полипептидных цепей с образованием указанной антигенсвязывающей молекулы.

Для рекомбинантного получения в соответствии с настоящим изобретением может быть использована любая клетка, подходящая для экспрессии полипептидов. Указанная клетка может представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой прокариотическая клетка, такую как клетка архей или бактерий. Согласно некоторым вариантам реализации указанные бактерии могут представлять собой грамотрицательные бактерии, такие как бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, например, *Escherichia coli*. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой эукариотическую клетку, такую как дрожжевая клетка, растительная клетка, клетка насекомых или клетка млекопитающего, например, клетку CHO, HEK (например, HEK293), HeLa или COS. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой клетку CHO, которая транзистентно или стабильно экспрессирует полипептиды.

В некоторых случаях указанная клетка не является прокариотической клеткой, поскольку некоторые прокариотические клетки не позволяют обеспечить такую же укладку или такие же посттрансляционные модификации, как эукариотические клетки. Кроме того, у эукариот возможны очень высокие уровни экспрессии и из эукариот может быть проще очистить белки с применением подходящих меток.

Могут также быть использованы специфические плазмиды, которые усиливают секрецию указанного белка в среде.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептиды могут быть получены с применением бесклеточного синтеза белка (CFPS), например, с применением системы, описанной в источнике: Zemella et al. *Chembiochem* (2015) 16(17): 2420-2431, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Получение может включать культивирование или ферментацию эукариотической клетки, модифицированной для экспрессии представляющего интерес полипептида или полипептидов. Указанные культивирование или ферментация могут быть проведены в биореакторе, подходящим образом обеспечивающем поступление питательных веществ, воздуха/кислорода и/или факторов роста. Секретируемые белки могут быть собраны путем отделения культуральной среды/ферментативного бульона от клеток, экстрагирования содержащегося в них белка и извлечения индивидуальных белков для выделения секретируемого полипептида или полипептидов. Методики культивирования, ферментации и разделения хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в источнике: Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4-е издание; включен в настоящий документ посредством ссылки выше).

Биореакторы включают один или более сосудов, в которых могут быть культивированы клетки. Культивирование в биореакторе может происходить в непрерывном режиме, когда в реактор поступает непрерывный поток реагентов, а из реактора выходит непрерывный поток культивируемых клеток. Как вариант, культивирование может происходить в периодическом режиме. Биореактор отслеживает и контролирует условия среды, такие как значения pH, содержание кислорода, скорость входящего и выходящего потока, а также перемешивание внутри сосуда, обеспечивая таким образом оптимальные условия для культивируемых клеток.

После культивирования клеток, которые экспрессируют антигенсвязывающую молекулу/антигенсвязывающий полипептид (полипептиды), может быть выделен представляющий интерес полипептид (полипептиды). Может быть использован любой подходящий способ извлечения белков из клеток, известный в данной области техники. Для выделения полипептида может быть необходимо извлечь клетки из питательной среды. Если происходит секреция полипептида (полипептидов) из клеток, указанные клетки могут быть путем центрифугирования извлечены из культуральной среды, которая содержит представляющий интерес секретируемый полипептид (полипептиды). Если представляющий интерес полипептид (полипептиды) собирают внутри клетки, выделение белка может включать центрифугирование для извлечения клеток из клеточной культуральной среды, обработку клеточного осадка буфером для лизиса и разрушения клеток например, с помощью ультразвука, быстрого замораживания-размораживания или осмотического лизиса.

Затем может быть желательным выделение представляющего интерес полипептида (полипептидов) из супернатанта или культуральной среды, которая может содержать другие белковые и небелковые компоненты. Общий подход к извлечению белковых компонентов из супернатанта или культуральной среды состоит в осаждении. Белки с разной растворимостью оседают при разных концентрациях осаждающего агента, такого как сульфат аммония. Например, при низких концентрациях осаждающего агента экстрагируют водорастворимые белки. Соответственно, добавление осаждающего агента в разных возрастающих концентрациях позволяет различить белки с разной растворимостью. Затем может быть использован диализ для удаления сульфата аммония из разделенных белков.

В данной области техники известны другие способы различения разных белков, например, ионообменная хроматография и размерная хроматография. Указанные способы могут применяться в качестве альтернативы осаждению или могут быть реализованы после осаждения.

После выделения представляющего интерес полипептида (полипептидов) из культуры может быть желательно или необходимо сконцентрировать указанный полипептид (полипептиды). В данной области техники известен ряд способов концентрации белков, таких как ультрафильтрация или лиофилизация.

Композиции

Согласно настоящему изобретению также предложены композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы, полипептиды, CAR, нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы и клетки, описанные в настоящем документе.

Антигенсвязывающие молекулы, полипептиды, CAR, нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы и клетки, описанные в настоящем документе, могут быть введены в состав фармацевтических композиций или лекарственных средств для клинического применения и могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант. Указанная композиция может быть введена в состав для местного, парентерального, системного, внутрисосудистого, внутривенного, интраартериального, внутримышечного, интратекального, интраокулярного, интраконтрактивального, внутриопухолевого, подкожного, внутрикожного, интратекального, перорального или чрескожного маршрутов введения, которые могут включать инъекции или инфузии.

Подходящие составы могут содержать антигенсвязывающую молекулу в стерильной или изотонической среде. Лекарственные средства и фармацевтические композиции могут быть введены в состав

текущей формы, в том числе гелеобразной. Текущие составы могут быть предназначены для введения путем инъекции или инфузии (например, посредством катетера) в выбранную область организма человека или животного.

Согласно некоторым вариантам реализации указанную композицию вводят в состав для инъекций или инфузии, например, в кровеносный сосуд или опухоль.

Согласно настоящему изобретению также предложены способы получения фармацевтически пригодных композиций, которые могут включать один или более этапов, выбранных из: получения антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или совокупности нуклеиновых кислот), экспрессионного вектора (или совокупности экспрессионных векторов) или клетки, описанных в настоящем документе; выделения антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или совокупности нуклеиновых кислот), экспрессионного вектора (или совокупности экспрессионных векторов) или клетки, описанных в настоящем документе; и/или смешивания антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или совокупности нуклеиновых кислот), экспрессионного вектора (или совокупности экспрессионных векторов) или клетки, описанных в настоящем документе с фармацевтически приемлемым носителем, адъювантом, вспомогательным веществом или разбавителем.

Например, дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу приготовления состава с лекарственным средством или фармацевтической композицией или получения лекарственного средства или фармацевтической композиции для применения в лечении заболевания/состояния (например, рака), при этом указанный способ включает приготовление состава с фармацевтической композицией или лекарственным средством путем смешивания антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или совокупности нуклеиновых кислот), экспрессионного вектора (или совокупности экспрессионных векторов) или клетки, описанных в настоящем документе с фармацевтически приемлемым носителем, адъювантом, вспомогательным веществом или разбавителем.

Терапевтическое и профилактическое применение

Антигенсвязывающие молекулы, полипептиды, CAR, нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы, клетки и композиции, описанные в настоящем документе, находят применение в терапевтических и профилактических способах.

Согласно настоящему изобретению предложены антигенсвязывающая молекула, полипептид, CAR, нуклеиновая кислота (или совокупность нуклеиновых кислот), экспрессионный вектор (или совокупность экспрессионных векторов), клетка или композиция, описанные в настоящем документе, для применения в способе медицинского лечения или профилактики. Также предложено применение антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или совокупности нуклеиновых кислот), экспрессионного вектора (или совокупности экспрессионных векторов), клетки или композиции, описанных в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения заболевания или состояния. Также предложен способ лечения или предотвращения заболевания или состояния, включающий введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или совокупности нуклеиновых кислот), экспрессионного вектора (или совокупности экспрессионных векторов), клетки или композиции, описанных в настоящем документе.

Указанные способы могут быть эффективными для уменьшения развития или прогрессирования заболевания/состояния, облегчения симптомов заболевания/состояния или снижения патологии заболевания/состояния. Указанные способы могут быть эффективны для предотвращения прогрессирования заболевания/состояния, например, для предотвращения усугубления или замедления скорости развития заболевания/состояния. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы могут обеспечивать улучшение при заболевании/состоянии, например, уменьшение симптомов заболевания/состояния или уменьшение какого-либо другого коррелята тяжести/активности заболевания/состояния. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы могут обеспечивать предотвращение развития более поздней стадии заболевания/состояния (например, хронической стадии или метастазирования). Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы могут быть эффективны для обращения или регресса заболевания/состояния, например, может происходить обращение патологии заболевания/состояния с более поздней стадии развития до более ранней стадии развития. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы могут быть эффективны для обращения или регресса симптомов заболевания/состояния или какого-либо другого коррелята тяжести/активности заболевания/состояния. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы могут быть эффективны для обращения/регресса заболевания/состояния до статуса, аналогичного статусу, наблюдаемому у субъекта без указанного заболевания/состояния.

Следует понимать, что объекты настоящего изобретения могут применяться для лечения/предотвращения любого заболевания/состояния, при котором обеспечивает терапевтическое или профилактическое преимущество снижение уровня (т.е. ингибирование или антагонизм) опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов, или снижение количества и/или активности клеток, экспрессирующих ИЛ-11R α или комплекс, содержащий ИЛ-11.

Например, указанное заболевание/состояние может представлять собой заболевание/состояние, в которое патологическим образом вовлечена передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, например, заболевание/состояние, при котором повышенный уровень опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов положительно ассоциирован с началом, развитием или прогрессированием заболевания/состояния, и/или тяжестью одного или более симптомов заболевания/состояния, или заболевание/состояние, фактором риска начала, развития или прогрессирования которого является повышенный уровень опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов.

Например, указанное заболевание/состояние может представлять собой заболевание/состояние, в которое патологическим образом вовлечены клетки, экспрессирующие ИЛ-11, например, заболевание/состояние, при котором повышенное число/повышенная доля клеток, экспрессирующих ИЛ-11 положительно ассоциированы с началом, развитием или прогрессированием заболевания/состояния, и/или тяжестью одного или более симптомов заболевания/состояния, или заболевание/состояние, фактором риска начала, развития или прогрессирования которого является повышенное число/повышенная доля клеток, экспрессирующих ИЛ-11.

Согласно некоторым вариантам реализации подлежащее лечению/предотвращению заболевание/состояние в соответствии с настоящим изобретением представляет собой заболевание/состояние, характеризующееся увеличением уровня опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов или его коррелятом (например, в органе /ткани, где проявляются симптомы заболевания/состояния) по сравнению с уровнем, опосредованным ИЛ-11 передачей сигналов/ его коррелятом в отсутствие заболевания/состояния.

Согласно некоторым вариантам реализации подлежащее лечению/предотвращению заболевание/состояние в соответствии с настоящим изобретением представляет собой заболевание/состояние, характеризующееся увеличением количества/доли/активности клеток, экспрессирующих ИЛ-11, например, по сравнению с количеством/долей/активностью клеток, экспрессирующих ИЛ-11 в отсутствие заболевания/состояния.

Согласно некоторым вариантам реализации субъект может быть выбран для лечения/профилактики согласно описанию в настоящем документе на основании обнаружения повышения уровня опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов или его коррелята, и/или увеличения количества/доли/активности клеток, экспрессирующих ИЛ-11, например, на периферии, или в органе/ткани, который поражен указанным заболеванием/состоянием (например, в органе/ткани, где проявляются симптомы заболевания/состояния). Указанное заболевание/состояние может поражать любую ткань, или орган, или систему органов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное заболевание/состояние может поражать несколько тканей/органов/систем органов.

Согласно некоторым вариантам реализации субъект может быть выбран для лечения /профилактики в соответствии с настоящим изобретением на основании определения того, что у указанного субъекта наблюдается повышение уровня опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов или его коррелята, и/или увеличение количества/доли/активности клеток, экспрессирующих ИЛ-11, например, на периферии или в органе/ткани, относительно уровня опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов/его коррелята или количества/доли/активности клеток, экспрессирующих ИЛ-11, у здорового субъекта.

Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению предпочтительно способны связываться с ИЛ-11 и содержащими ИЛ-11 молекулами/комплексами (например, комплексом ИЛ-11:ИЛ-11R α) и ингибировать их биологическую активность. Соответственно, антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению находят применение при лечении или предотвращении заболеваний и расстройств, в патологию которых вовлечен ИЛ-11. Соответственно, антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению находят применение при лечении или предотвращении заболеваний и расстройств, ассоциированных с опосредованной ИЛ-11 передачей сигналов.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное заболевание/расстройство может быть ассоциировано с повышенной экспрессией гена или белка ИЛ-11, ИЛ-11R α и/или gp130, например, по сравнению с контрольным состоянием (т.е. без заболевания). Согласно некоторым вариантам реализации указанное заболевание/расстройство может быть ассоциировано с повышенным уровнем опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов по сравнению с контрольным состоянием. Согласно некоторым вариантам реализации указанное заболевание/расстройство может быть ассоциировано с повышенным уровнем передачи сигналов через пути ERK и/или STAT3 по сравнению с контрольным состоянием. Согласно некоторым вариантам реализации повышенная экспрессия/активность ИЛ-11, ИЛ-11R α и/или gp130, и/или повышенный уровень опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов может наблюдаться в эффекторных клетках указанного заболевания/расстройства. Согласно некоторым вариантам реализации повышенная экспрессия/активность ИЛ-11, ИЛ-11R α и/или gp130, и/или повышенный уровень опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов может наблюдаться в клетках, не являющихся эффекторными клетками.

Передача сигналов через ERK может быть измерена например, с применением анализа фосфорилирования ERK, такого как анализ, описанный в руководстве: Assay Guidance Manual: Phospho-ERK Assays, Kim E. Garbison, Beverly A. Heinz, Mary E. Lajiness, Jeffrey R. Weidner, G. Sitta Sittampalam, Eli Lilly & Company, Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., eds, Bethesda (MD): Eli Lilly & Company/National

Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Передача сигналов через STAT3 может быть измерена, например, с применением анализа фосфорилирования STAT3, такого как набор для анализа Phospho-STAT3 (Tyr705) Cellular Assay Kit (Cisbio Assays).

Согласно некоторым вариантам реализации лечение представляет собой лечение заболевания/расстройства, при котором снижение опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов оказывает терапевтическое действие. Согласно некоторым вариантам реализации лечение представляет собой лечение заболевания/расстройства, ассоциированного с избыточной ERK- и/или STAT3-передачей сигналов. Согласно некоторым вариантам реализации лечение представляет собой лечение заболевания/расстройства, ассоциированного с избыточной пролиферацией или избыточной активацией фибробластов, или ассоциированного с избытком миофибробластов.

Согласно некоторым вариантам реализации лечение может быть направлено на предотвращение или лечение заболевания/расстройства путем уменьшения количества или доли миофибробластов или α SMA-положительных фибробластов.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное заболевание/расстройство может представлять собой фиброз, фиброзное состояние или заболевание/расстройство, характеризующееся фиброзом. В настоящем документе "фиброз" относится к образованию избытка волокнистой соединительной ткани в результате избыточного отложения компонентов внеклеточного матрикса, например коллагена. Волокнистая соединительная ткань характеризуется внеклеточным матриксом (ВКМ) с высоким содержанием коллагена. Коллаген может быть представлен пучками или волокнами, которые могут быть расположены нерегулярным образом или выравнены. ВКМ волокнистой соединительной ткани может также включать гликозаминогликаны.

В настоящем документе "избыток волокнистой соединительной ткани" относится к количеству соединительной ткани в определенном местоположении (например, в определенной ткани или определенном органе, или части определенной ткани или определенного органа), превышающему количество соединительной ткани в указанном местоположении в отсутствие фиброза, например, в нормальных, непатологических условиях. В настоящем документе "избыточное отложение компонентов внеклеточного матрикса" относится к уровню отложения одного или более компонентов внеклеточного матрикса, превышающему уровень отложения в отсутствие фиброза, например, в нормальных, не патологических условиях.

Клеточные и молекулярные механизмы фиброза описаны в источниках: Wynn, J. *Pathol.* (2008) 214(2):199-210, и Wynn and Ramalingam, *Nature Medicine* (2012) 18:1028-1040, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. Главными клеточными эффекторами фиброза являются миофибробласты, которые продуцируют богатый коллагеном внеклеточный матрикс.

В ответ на повреждение ткани поврежденные клетки и лейкоциты продуцируют профибротические факторы, такие как TФР- β , ИЛ-13 и TРФ, которые активируют фибробласты с переходом в α SMA-экспрессирующие миофибробласты, и рекрутируют миофибробласты в сайт повреждения. Миофибробласты продуцируют значительное количество внеклеточного матрикса, и являются важными посредниками при стягивании и закрытии ран. Однако в условиях персистирующей инфекции или при хроническом воспалении могут наблюдаться избыточная активация и рекрутинг миофибробластов, и, соответственно, избыточное продуцирование компонентов внеклеточного матрикса, что приводит к образованию избытка волокнистой соединительной ткани.

Согласно некоторым вариантам реализации фиброз могут запускать патологические состояния, например, состояния, инфекции или болезненные состояния, которые приводят к продуцированию профибротических факторов, таких как TФР- β 1. Согласно некоторым вариантам реализации фиброз может быть вызван физическим повреждением/физическими стимулами, химическим повреждением/химическими стимулами или вызванным факторами среды повреждением/стимулами среды. Физическое повреждение/физические стимулы могут возникать при хирургических вмешательствах, как, например, ятрогенные причины. Химическое повреждение/химические стимулы могут включать индуцированный лекарственными средствами фиброз, например, после хронического введения таких лекарственных средств, как блеомицин, циклофосфамид, амиодарон, прокаинамид, пеницилламин, золото и нитрофурантоин (Daba et al., *Saudi Med J* 2004 Jun; 25(6): 700-6). Вызванное факторами среды повреждение/стимулы среды могут включать воздействие волокнами асбеста или кремния.

Фиброз может возникать во многих тканях организма. Например, фиброз может возникать в легких, печени (например, цирроз), почке, сердце, кровеносных сосудах, глазу, коже, поджелудочной железе, селезенке, кишечнике (например, толстом или тонком кишечнике), головном мозге и костном мозге. Фиброз может также возникать одновременно в нескольких органах.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения в фиброз может быть вовлечен орган желудочно-кишечной системы, например, печень, тонкий кишечник, толстый кишечник или поджелудочная железа. Согласно некоторым вариантам реализации в фиброз может быть вовлечен орган дыхательной системы, например, легкие. Согласно вариантам реализации в фиброз может быть вовлечен орган сердечно-сосудистой системы, например, сердце или кровеносные сосуды. Согласно некоторым вариантам

там реализации в фиброз может быть вовлечена кожа. Согласно некоторым вариантам реализации в фиброз может быть вовлечен орган нервной системы, например, головной мозг. Согласно некоторым вариантам реализации в фиброз может быть вовлечен орган мочевыделительной системы, например, почки. Согласно некоторым вариантам реализации в фиброз может быть вовлечен орган скелетно-мышечной системы, например, мышечная ткань.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации указанный фиброз представляет собой фиброз сердца или миокардиальный фиброз, фиброз печени или ренальный фиброз. Согласно некоторым вариантам реализации фиброз сердца или миокардиальный фиброз ассоциирован с дисфункцией мускулатуры или электрических свойств сердца, или утолщением стенок или клапанов сердца. Согласно некоторым вариантам реализации фиброз представляет собой фиброз предсердий и/или желудочков сердца. Лечение или предотвращение фиброза предсердий и/или желудочков может способствовать снижению риска предсердной фибрилляции, фибрилляции желудочков или инфаркта миокарда.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации фиброз печени ассоциирован с хронической печеночной недостаточностью или циррозом печени. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации ренальный фиброз ассоциирован с хронической болезнью почек.

Заболевания/расстройства, характеризующиеся фиброзом в соответствии с настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь перечисленными: респираторные заболевания, такие как фиброз легких, кистозный фиброз, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), массивный прогрессивный фиброз, склеродермию, облитерирующий бронхиолит, синдром Германски-Пудлака, асбестоз, силикоз, хроническую легочную гипертензию, ассоциированную со СПИД легочную гипертензию, саркоидоз, строму опухоли при заболевании легких и астму; хроническую печеночную недостаточность, первичный билиарный цирроз (ПБЦ), шистосомную болезнь печени, цирроз печени, стеатогепатит, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), НАСГ на ранней стадии, НАСГ на поздней стадии, алкогольный стеатогепатит, стеатоз; такие состояния поджелудочной железы, как хронический панкреатит и фиброз поджелудочной железы; такие состояния сердечно-сосудистой системы, как гипертрофическая кардиомиопатия, дилатационная кардиомиопатия (ДХМ), фиброз предсердия, предсердная фибрилляция, фиброз желудочка, фибрилляция желудочков, миокардиальный фиброз, синдром Бругада, миокардит, эндомикардиальный фиброз, инфаркт миокарда, фиброзное заболевание сосудов, гипертензивная болезнь сердца, аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АДПЖ), тубулоинтерстициальный и клубочковый фиброз, атеросклероз, варикозное расширение вен, церебральные инфаркты; такие неврологические состояния, как глиоз и болезнь Альцгеймера; мышечную дистрофию, такую как мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) или мышечная дистрофия Беккера (BMD); такие состояния желудочно-кишечного тракта, как болезнь Крона, микроскопический колит и первичный склерозирующий холангит (ПСХ); такие состояния кожи, как склеродермия, нефрогенный системный фиброз и кожный келоид; артрофиброз; контрактуру Дюпюиттена; фиброз средостения; забрюшинный фиброз; миелофиброз; болезнь Пейрони; адгезивный капсулит; заболевание почек (например, ренальный фиброз, нефритический синдром, синдром Альпорта, ВИЧ-ассоциированную нефропатию, поликистозную болезнь почек, болезнь Фабри, диабетическую нефропатию, хронический гломерулонефрит, нефрит, ассоциированный с системной волчанкой, интерстициальный фиброз почек (IF)); повреждение почек, например, острое повреждение почек/почечную недостаточность; нефротоксичность; прогрессирующий системный склероз (ПСС); хроническая болезнь "трансплантат против хозяина"; заболевания/расстройства глаза и ассоциированные процессы, такие как офтальмопатия Грейвса, эпиретинальный фиброз (например, диабетическую ретинопатию (DR)), глаукому, субретинальный фиброз (например, ассоциированный с макулярной дегенерацией (например, влажную или сухую возрастную макулярную дегенерацию (AMD))), макулярный отек, формирование друз, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV), послеоперационный фиброз (например, задней капсулы хрусталика после операции по удалению катаракты или фильтрационной подушки после глаукомной хирургии), конъюнктивальный фиброз, субконъюнктивальный фиброз; артрит; фиброзную пренеопластическую и фиброзную неопластическую болезнь; и фиброз, индуцированный химическим повреждением или повреждающим фактором среды (например, противораковой химиотерапией, пестицидами, радиацией /противораковой радиационной терапией).

НАСГ на ранней стадии относится в настоящем документе к стадиям стеатоза при жировой болезни печени, например, НАЖБП, которая может переходить в состояние НАСГ, при котором печень воспалена. Поздняя стадия НАСГ относится в настоящем документе к состояниям персистирующего воспаления печени, которые могут включать фиброз.

Следует понимать, что многие из заболеваний/расстройств, перечисленных выше, взаимосвязаны. Например, фиброз желудочка может возникать после инфаркта миокарда и ассоциирован с ДХМ, НСМ и миокардитом.

Согласно конкретным вариантам реализации указанное заболевание/расстройство может представлять собой что-либо из фиброза легких, предсердной фибрилляции, фибрилляции желудочков, гипертрофической кардиомиопатии (НСМ), дилатационной кардиомиопатии (ДХМ), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), цирроза, хронической болезни почек, склеродермии, системного склероза, келоида, кистозного фиброза, болезни Крона, послеоперационного фиброза или фиброза сетчатки, например, ассо-

цированного с влажной формой возрастной макулярной дегенерации (AMD).

Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы могут быть эффективны для обращения или регресса фиброза. Фиброз может представлять собой сформировавшийся или тяжелый фиброз и может быть ассоциирован с любыми из заболеваний/состояний, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы могут быть эффективными для обращения или регресса любых из заболеваний/расстройств согласно настоящему описанию.

Фиброз может прямо или непрямо приводить и/или повышать склонность к развитию заболеваний/расстройств. Например, более чем 80% случаев гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) развиваются в фиброзной или циррозной печени (Affo et al. 2016, Annu Rev Pathol.), что предполагает важную роль фиброза печени в предзлокачественной среде (PME) печени.

Соответственно, антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению находят применение в способах лечения и предотвращения заболеваний/расстройств, ассоциированных с фиброзом, и/или заболеваний/расстройств, для которых фиброз является фактором риска. Согласно некоторым вариантам реализации заболевание/расстройство, ассоциированное с фиброзом, или заболевание/расстройство, для которого фиброз является фактором риска, представляет собой рак, например рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному).

ИЛ-11 также вовлечен в патологию других заболеваний/расстройств, и антитела и фрагменты согласно настоящему изобретению, соответственно, также находят применение в способах лечения, предотвращения, облегчения, и/или обращения или регресса симптомов указанных заболеваний/расстройств.

Согласно некоторым вариантам реализации фиброз может быть ассоциирован с ангиогенезом, например, в глазу. Согласно некоторым вариантам реализации способы лечения или предотвращения фиброза, способы определения пригодности субъекта для такого лечения/предотвращения и способы диагностики/прогнозирования фиброза согласно описанию в настоящем документе также применимы к лечению/предотвращению/диагностике/прогнозированию ангиогенеза; справедливо и обратное. Фиброз глаза может быть ассоциирован с хориоидальной неоваскуляризацией (CNV).

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению для применения в способах лечения и/или предотвращения метаболических заболеваний. Соответственно, согласно настоящему изобретению предложено лечение/предотвращение метаболических заболеваний путем ингибирования опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов, например, в клетке, ткани/органе/системе органов/у субъекта. В настоящем документе "метаболическое заболевание" относится к любому заболеванию или состоянию, которое вызвано или характеризуется аномальным метаболизмом. "Метаболизм" в указанном контексте относится к преобразованию/обработке в организме источников энергии, например веществ, потребляемых для обеспечения питания, для получения энергии и/или для сохранения. "Нормальный метаболизм" может представлять собой метаболизм здорового субъекта, не страдающего заболеванием, например не страдающего метаболическим заболеванием, или субъекта, у которого не наблюдаются симптомы/корреляты метаболического заболевания.

У субъекта, страдающего метаболическим заболеванием, может наблюдаться аномальный метаболизм. У субъекта, страдающего метаболическим заболеванием, может наблюдаться симптом/коррелят аномального метаболизма. У субъекта, страдающего метаболическим заболеванием, может быть диагностировано метаболическое заболевание. Субъект может удовлетворять диагностическим критериям для диагностики метаболического заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено лечение/предотвращение заболеваний/состояний у субъекта с неудовлетворительным прогнозом по причине метаболического заболевания.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное метаболическое заболевание поражает что-либо одно или более из печени, поджелудочной железы, сердечно-сосудистой системы, пищеварительной системы, выделительной системы, дыхательной системы, системы почек, репродуктивной системы, системы кровообращения, мышечной системы, эндокринной системы, экзокринной системы, лимфатической системы, иммунной системы, нервной системы и/или скелетной системы.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное метаболическое заболевание представляет собой или включает (например, характеризуется наличием): ожирение, диабет II типа (T2D), диабет I типа (T1D), преддиабет, избыточная масса тела, метаболический синдром, ассоциированную с беременностью гипергликемию (т.е. гестационный диабет), холестатическое заболевание печени, гипергликемию, гиперлипидемию, гипертриглицеридемию, гиперхолестеринемию, истощение, кахексию, ассоциированное с химиотерапией снижение массы тела, недостаточность поджелудочной железы, панкреатит, острый панкреатит, хронический панкреатит, стеатоз, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольную жировую дистрофию печени (NAFL), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), липодистрофию, липогипертрофию, липоатрофию, дефицит инсулина, инсулинорезистентность и гипергликокемию. Согласно некоторым вариантам реализации указанное метаболическое заболевание представляет собой или включает ожирение. Согласно некоторым вариантам реализации указанное метаболическое заболевание представляет собой или включает холестаза, т.е. снижение поступления желчи из печени в двенадцатиперстную кишку. Указанное заболевание может представлять собой холестатиче-

ское заболевание печени (источники: Jansen et al., *Hepatology* (2017) 65(2):722-738 и Pollock and Minuk, *J Gastroenterol Hepatol* (2017) 32(7): 1303-1309, оба из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок), в том числе, например, первичный билиарный холангит (ПБХ) и первичный склерозирующий холангит (ПСХ).

Аспекты настоящего изобретения относятся к лечению и/или предотвращению аберрантной и/или недостаточной функции клеток/тканей/органов/систем органов, играющих роль в метаболизме. В частности, настоящим изобретением предусмотрено лечение и/или предотвращение аберрантной функции и/или недостаточной функции клеток поджелудочной железы/ткани поджелудочной железы/поджелудочной железы, а также лечение и/или предотвращение аберрантной функции и/или недостаточной функции клеток печени/ткани печени/печени.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное метаболическое заболевание представляет собой или включает истощение. В настоящем документе термин "истощение" относится к непроизвольному снижению массы тела, которое может быть прогрессирующим и/или дегенеративным. Истощение может быть определено как потеря мышц наряду с потерей жировой массы тела или без потери жировой массы тела, и, как правило, включает значимое, обычно непроизвольное снижение массы тела (в том числе массы скелетных мышц); и может включать или не включать потерю жировой ткани. В некоторых случаях истощение жировой ткани может происходить отдельно, что наблюдается при липодистрофических заболеваниях. Истощение может быть охарактеризовано отрицательным балансом белка и энергии, обусловленным варьирующими комбинациями сниженного потребления пищи и аномального метаболизма (Fearon et al. *Lancet Oncol.* (2011) 12(5):489-95). Истощение может приводить к прогрессирующим функциональным нарушениям, снижению качества жизни, повышенному риску заболеваемости и смертности. В некоторых случаях истощение приводит к астении (аномальной физической слабости или недостаточности энергии) и/или анемии (дефициту эритроцитов или гемоглобина в крови). В некоторых случаях истощение не может быть полностью обращено путем стандартной алиментарной поддержки или терапевтических вмешательств, которые были испытаны к настоящему времени. Смертельный исход наступает, как правило, после снижения массы тела на 30% относительно ретроспективной стабильной массы тела пациента (Tisdale, *Nature Reviews Cancer*, 2, 862-871 (2002)).

Заболевания/состояния, характеризующиеся истощением, включают кахексию (не связанную с возрастом потерю мышечной массы), саркопению (потерю мышечной массы: например, возрастную, связанную с отсутствием нагрузки, космическими полетами или денервацией), анорексические расстройства (белково-энергетическую недостаточность), мышечные дистрофии, липодистрофии (например, аномальное или дегенеративное состояние жировой ткани), липоатрофию (связанную с возрастом потерю подкожного жира на лице и в других тканях) и миопению (истощение мышечной ткани при любой хронической болезни; предложено в источнике: Fearon et al. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011; 2:1-3). В настоящем документе заболевания/состояния, характеризующиеся истощением, также называются "истощающими расстройствами". Согласно некоторым вариантам реализации истощающее расстройство в соответствии с настоящим изобретением представляет собой кахексию, прекахексию, рефрактерную кахексию, саркопению, анорексию, липодистрофию, липоатрофию и/или миопению. Согласно некоторым вариантам реализации, в соответствии с различными аспектами, описанными в настоящем документе, истощающее расстройство представляет собой кахексию, прекахексию и/или рефрактерную кахексию.

Истощающие расстройства, возникающие в результате хронических болезней, могут включать "легкое истощающее заболевание мышечной ткани" (с синдромом астении или без синдрома астении), "умеренное истощающее заболевание мышечной ткани" (с синдромом астении или без синдрома астении; иногда называемое "прекахексией") или "тяжелое истощающее заболевание мышечной ткани" (иногда называемое "кахексией", часто с синдромом астении). Кахексия может быть определена как непроизвольное снижение массы тела >5% относительно ретроспективной стабильной массы тела, как индекс массы тела (BMI) <20 кг/м² (для индивидуумов младше 65 лет) или <22 кг/м² (для индивидуумов в возрасте 65 или старше) с любой степенью снижения массы тела >2% или индекс скелетных мышц, соответствующий саркопении, при любой степени снижения массы тела >2%. У субъекта может также наблюдаться жировая масса тела < 10% и/или низкий уровень альбумина в крови, <35 г/л. Указанные критерии могут также помогать идентифицировать популяции "с риском" развития истощающего расстройства (Fearon et al. *Lancet Oncol.* 2011; 12(5):489-95).

Была предложена трехступенчатая классификация кахексии, согласно которой тяжесть классифицируют в соответствии со степенью истощения запасов энергии и белка в организме (BMI) в сочетании со степенью продолжающегося снижения массы тела.

1. Прекахексия - когда снижение массы тела пациента составляет <5%, однако серьезные осложнения еще не развились.

2. Кахексия - если синдром прогрессирует при снижении массы тела, превышающем указанные выше показатели, но все еще потенциально поддается лечению.

3. Рефрактерная кахексия - момент, начиная с которого заболевание перестает отвечать на лечение, или нагрузка и риски перевешивают преимущества лечения (Fearon et al, выше). Часто рефрактерная ста-

дия обусловлена общей стадией основного заболевания, описанного ниже, и состоянием пациента.

Метаболические заболевания могут присутствовать в форме острых или хронических заболеваний. Аспекты настоящего изобретения предусматривают лечение/предотвращение заболеваний/состояний, ассоциированных с метаболическими заболеваниями. Заболевания/состояния, ассоциированные с метаболическими заболеваниями, включают заболевания/состояния, положительно ассоциированные с началом метаболического заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации заболевание/состояние, ассоциированное с метаболическим заболеванием, представляет собой заболевание/состояние, которое может вызывать/вызывает/вызвало метаболическое заболевание (т.е. может приводить, приводит или привело к метаболическому заболеванию).

Заболевания/состояния, ассоциированные с метаболическими заболеваниями, также включают заболевания/состояния, который вызывает и/или усугубляет (приводит к ухудшению, прогрессированию и/или осложнению) метаболическое заболевание. Согласно некоторым вариантам реализации заболевание/состояние, ассоциированное с метаболическим заболеванием, может быть положительно ассоциировано с началом метаболического заболевания, а также метаболическое заболевание может его усугублять. "Ассоциированное" заболевание/состояние может представлять собой заболевание/состояние, включающее связанную с метаболическим заболеванием патологию.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения метаболическое заболевание или заболевание/состояние, ассоциированное с метаболическим заболеванием, может присутствовать в любом органе/ткани или поражать любой орган/ткань, например, сердце, печень, почки, мозг, кожу, мышечную систему, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, поджелудочную железу, рот, слюнные железы, глотку, пищевод, желчный пузырь, трахею, гортань, мочевого пузыря, яичник, матку, семенники, железы эндокринной системы, например, гипофиз или щитовидную железу, лимфатическую систему, например, селезенку.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения заболевание/состояние, ассоциированное с метаболическим заболеванием, может представлять собой что-либо одно или более из рака, заболевания сердца, заболевания почек, заболевания легких, заболевания печени, хронической инфекции, неврологических дегенеративных заболеваний, острого повреждения, травматического повреждения/травмы, послеоперационных состояний или возрастных изменений/старения.

В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения способ лечения и/или предотвращения метаболического заболевания в соответствии с настоящим изобретением может включать что-либо одно или более из следующего:

- снижение уровня липидов в крови;
- снижение уровня глюкозы в крови;
- повышение толерантности к глюкозе (например, субъекта с непереносимостью глюкозы);
- повышение толерантности к инсулину (например, у субъекта с инсулинорезистентностью);
- повышение функции поджелудочной железы;
- снижение массы тела (например, у субъекта с лишним весом/ожирением);
- снижение жировой массы тела;
- увеличение безжировой массы тела;
- снижение уровня глюкозы в крови натощак;
- снижение уровня триглицеридов в сыворотке;
- снижение уровня холестерина в сыворотке;
- повышение толерантности к глюкозе;
- повышение функции поджелудочной железы (например, экзокринной и/или эндокринной функции);
- усиление роста ткани поджелудочной железы;
- регенерация ткани поджелудочной железы;
- снижение массы поджелудочной железы;
- уменьшение гиперплазии островковых клеток поджелудочной железы;
- снижение экспрессии глюкагона;
- повышение экспрессии инсулина;
- снижение массы тела (например, у субъекта, страдающего истощающим заболеванием, например, кахексией);
- снижение экспрессии белка ИЛ-11 в печени;
- уменьшение активации Erk в печени;
- уменьшение стеатоза, например, печени;
- снижение уровня триглицеридов в печени;
- снижение уровня АЛТ в сыворотке;
- снижение экспрессии провоспалительного фактора (например, ФНО- α , CCL2, CCL5, ИЛ-6, CXCL5 и/или CXCL1);
- снижение экспрессии профибротического фактора (например, ИЛ-11, TIMP1, АСТА2, ТФР- β 1,

MMP2, TIMP2, MMP9, COL1A2, COL1A1 и/или COL3A1);

снижение уровня ТФР- β 1 в сыворотке;

снижение экспрессии/продуцирования клетками HSC ИЛ-11, АСТА2, MMP2, ТФР- β 1, ТРФ, ANG II, bFGF, CCL2 и/или H2O2;

ингибирование перехода HSC в миофибробласты клетками HSC;

уменьшение количества/доли миофибробластов в печени;

уменьшение уровня гидроксипролина в печени;

повышение функции печени;

повышение функции органа/ткани, пораженных метаболическим заболеванием;

уменьшение повреждения печени; и

уменьшение количества/доли CD45+ клеток в печени.

Было обнаружено, что ИЛ-11 вовлечен в развитие и прогрессирование различных видов рака. Исследования предполагают, что ИЛ-11 важен для стимуляции хронического воспаления ЖКТ и ассоциированного туморогенеза при раке желудка, ободочной кишки, гепатоцеллюлярном раке и раке молочной железы за счет избыточной активации STAT3 (Ernst M., et al. *J Clin Invest.* (2008);118:1727-1738), что ИЛ-11 может способствовать туморогенезу, запуская путь внутриклеточной передачи сигналов JAK-STAT, и может также способствовать метастазированию за счет передачи сигналов через путь PI3K-AKT-mTORC1 (Xu et al., *Cancer Letters* (2016) 373(2):156-163). ИЛ-11, за счет STAT3, способствует выживанию, пролиферации, инвазии, ангиогенезу и метастазированию, сигнальная ось ИЛ-11/GP130/JAK/STAT3 может быть ограничивающей скоростью для прогрессирования опухолей желудочно-кишечного тракта, и повышенная экспрессия ИЛ-11 ассоциирована с неудовлетворительным прогнозом у пациентов с раком молочной железы (Johnstone et al., *Cytokine & Growth Reviews* (2015)) 26(5): 489-498). Было также показано, что ИЛ-11 влияет на динамику стволовых клеток рака молочной железы и гетерогенность опухолей (Johnstone et al., *Cytokine & Growth Reviews* (2015)) 26(5): 489-498). Недавно было обнаружено, что передача сигналов ИЛ-11 вовлечена в хеморезистентность аденокарциномы легкого; ассоциированные с раком фибробласты, как было обнаружено, повышают регуляцию ИЛ-11, и придают хеморезистентность раковым клеткам легких посредством активации антиапоптотического сигнального пути ИЛ-11/ИЛ-11R/STAT3 (Tao et al. 2016, *Sci Rep.* 6;6:38408). Передача сигналов ИЛ-11 может способствовать переходу фибробластов в миофибробласты и продуцированию внеклеточного матрикса фибробластами в предзлокачественной среде (PME) и микроокружении опухоли (TME).

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению для применения в способах лечения/предотвращения рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак может представлять собой рак, который приводит прямо или непрямо к воспалению и/или фиброзу.

Рак может представлять собой любую нежелательную пролиферацию клеток (или любое заболевание, проявляющееся нежелательной пролиферацией клеток), новообразование или опухоль, или повышенный риск, или предрасположенность к нежелательной пролиферации клеток, новообразованию или опухоли. Рак может быть доброкачественным или злокачественным, и может быть первичным или вторичным (метастатическим). Новообразование или опухоль может представлять собой любой аномальный рост или пролиферацию клеток, и может локализоваться в любой ткани.

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению для применения в способах лечения/предотвращения рака, например, эпителиально-клеточного рака, рака молочной железы, рака желудочно-кишечного тракта (например, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени (например, ГЦК), рака желчного пузыря, рака ободочной и прямой кишки, рака анального канала, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта и рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) или мелкоклеточного рака легкого (МРЛ)). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак, для которого является фактором риска острое и/или хроническое воспаление. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак, для которого является фактором риска заболевание/расстройство, характеризующееся фиброзом (например, согласно описанию в настоящем документе).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак может быть ассоциирован с повышенной экспрессией гена или белка ИЛ-11, ИЛ-11R α и/или gp130. Например, клетки рака могут характеризоваться повышенной экспрессией ИЛ-11, ИЛ-11R α и/или gp130 по сравнению с сопоставимыми нераковыми клетками, или могут быть ассоциированы с повышенной экспрессией ИЛ-11, ИЛ-11R α и/или gp130 другими клетками (например, нераковыми клетками) по сравнению с уровнем экспрессии сопоставимыми клетками в отсутствие рака (например, у здорового контрольного субъекта). Согласно некоторым вариантам реализации может быть определено, что клетки рака характеризуются повышенным уровнем передачи сигналов через пути ERK и/или STAT3 по сравнению с сопоставимыми нераковыми клетками.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак может быть ассоциирован с мутацией ИЛ-11, ИЛ-11R α и/или gp130. Согласно некоторым вариантам реализации такая мутация может быть

ассоциирована с повышенным уровнем экспрессии гена или белка, или может быть ассоциирована с повышенным уровнем передачи сигналов ИЛ-11/ИЛ-11R относительно уровня экспрессии/передачи сигналов, наблюдаемого в отсутствие мутации.

Также показано, что ИЛ-11 вовлечен в заболевания/расстройства, характеризующиеся воспалением. Внутрисуставное инъекционное введение ИЛ-11, как было показано, вызывает воспаление сустава (Wong et al., *Cytokine* (2005) 29:72-76), и, как было показано, ИЛ-11 является провоспалительным в сайтах опосредованного ИЛ-13 воспаления тканей (Chen et al., *J Immunol* (2005) 174:2305-2313). Также наблюдалось значимое повышение экспрессии ИЛ-11 в очагах хронического поражения кожи при атопическом дерматите, и известно, что он вовлечен в воспаление бронхов (Toda et al., *J Allergy Clin Immunol* (2003) 111:875-881). Передача сигналов, опосредованная ИЛ-11, вовлечена в воспалительное заболевание кишечника (IBD) и астму (Putoczki and Ernst, *J Leuko Biol* (2010) 88(6):1109-1117). ИЛ-11 также был идентифицирован как фактор риска рассеянного склероза; уровень ИЛ-11 повышен в спинномозговой жидкости пациентов с клинически изолированным синдромом (КИС) по сравнению с контрольными субъектами, и уровни ИЛ-11 в сыворотке выше во время рецидивов у пациентов с рецидивирующе-ремиттирующим рассеянным склерозом, и ИЛ-11 может способствовать дифференцировке CD4⁺ Т-клеток в фенотип TH17 - клетки TH17 важны для патогенеза рассеянного склероза (Zhang et al., *Oncotarget* (2015) 6(32): 32297-32298).

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению для применения в способах лечения/предотвращения заболевания/расстройства, характеризующегося воспалением. Согласно некоторым вариантам реализации заболевание или расстройство, характеризующееся воспалением, может представлять собой заболевание/расстройство, которое приводит прямо или непрямо к раку и/или фиброзу. Заболевания, характеризующиеся воспалением, включают например, аллергическое воспаление, такое как аллергическая астма и воспаление бронхов, атопический дерматит, аллергический ринит и аллергические заболевания глаз, и аутоиммунные заболевания, такие как рассеянный склероз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, хронический активный гепатит, сахарный диабет I типа, целиакия, болезнь Грейвса, увеит, пузырчатка, псориаз, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника, анемия и аутоиммунный тиреоидит.

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению для применения в способах лечения/предотвращения гепатотоксичности и заболеваний/расстройств, характеризующихся гепатотоксичностью. В настоящем документе, гепатотоксичность относится к повреждению и/или смерти клеток/ткани печени. Гепатотоксичность могут относиться к состоянию токсического повреждения печени, в частности, к смерти гепатоцитов в печени. Гепатотоксичность может быть определена/диагностирована путем обнаружения одного или более коррелятов гепатотоксичности согласно описанию в настоящем документе ниже. Гепатотоксичность может возникать вследствие гепатотоксического поражения. В настоящем документе "гепатотоксическое поражение" относится к любому лечению, событию или условиям, приводящим к гепатотоксичности. Например, гепатотоксическое поражение может быть вызвано химическим/физическим лечением/воздействием, или газовой средой. Согласно некоторым вариантам реализации гепатотоксическое поражение является химическим, например, в случае лекарственно-индуцированного повреждения печени, например, АРАР-индуцированная гепатотоксичность. Согласно некоторым вариантам реализации гепатотоксическое поражение является физическим, например, в случае гепатотоксичности, возникающей в результате хирургического повреждения ткани печени, которое может происходить, например, при хирургическом вмешательстве для лечения заболевания, и/или при трансплантации печени (например, гепатотоксичность может иметь ятрогенные причины). Согласно некоторым вариантам реализации гепатотоксическое поражение возникает в результате гипоксии, например, вследствие ишемии, или может быть результатом реперфузии (например, гепатотоксическое поражение может возникать в результате ИРП).

Гепатотоксичность может представлять собой химически обусловленное повреждение печени, например, ущерб или повреждение, вызванные лекарством, химическим веществом, ишемией, реперфузией, сепсисом, или растительными или диетическими добавками. Согласно некоторым вариантам реализации гепатотоксичность относится к лекарственно-индуцированному повреждению печени (DILI). Согласно некоторым вариантам реализации гепатотоксичность относится к повреждению печени, вызванному гепатотоксином. Гепатотоксин может быть представлен алкоголем. Гепатотоксичность может также называться токсическим гепатитом. Гепатотоксичность может относиться к острой и/или хронической гепатотоксичности.

Гепатотоксичность может быть вызвана, прямо или непрямо, приемом алкоголя, например, хроническим употреблением алкоголя. Гепатотоксичность согласно определению в настоящем документе может быть вызвана, прямо или непрямо, голоданием, недостаточностью питательных веществ, инфицированием инфекционным агентом (например, вирусом гепатита (например, гепатита А, В, С, D или Е), ВИС), раком или взаимодействиями лекарственных средств.

Гепатотоксичность может быть ассоциирована с другими расстройствами, заболеваниями и состоя-

ниями. Расстройства, заболевания или состояния, ассоциированные с гепатотоксичностью, включают острое повреждение печени (ALI), острую печеночную недостаточность, острое заболевание печени, хроническую печеночную недостаточность, повреждение печени, гепатит, например, вирусный гепатит, алкогольный гепатит, ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) печени, например, "теплая" ишемия/реперфузия (WIR), индуцированное радиацией заболевание печени (RILD), лекарственно-индуцированное повреждение печени (DILI), аутоиммунное повреждение печени, холестатическое заболевание печени, ВИЧ и рак.

Лекарственно-индуцированное повреждение печени (DILI) включает внутреннюю и идиосинкразическую гепатотоксичность, а идиосинкразическая DILI дополнительно включает аллергические и неаллергические реакции. Внутренний механизм связан с дозозависимой гепатотоксичностью, тогда как идиосинкразическая гепатотоксичность не является дозозависимой и может происходить непредсказуемым образом. Аллергическая идиосинкразическая гепатотоксичность дополнительно характеризуется присутствием симптомов и признаков типичной реакции адаптивной иммунной системы, в том числе лихорадкой, кожными реакциями, эозинофилией, образованием аутоантител и коротким латентным периодом, в частности, после повторного воздействия (Khoury et al., *J Clin Transl Hepatol.* 2015 Jun 28; 3(2):99-108).

Согласно некоторым вариантам реализации антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут применяться для диагностики, лечения и профилактики индуцированной ацетаминофеном (АРАР) гепатотоксичности. Ацетаминофен также известен как N-ацетил-п-аминофенол или парацетомол, или под торговыми наименованиями тайленол и панadol. Интоксикация ацетаминофеном приводит к гепатотоксичности, ассоциированной с повышенными концентрациями в сыворотке гепатоцеллюлярных ферментов "утечки", таких как аспаратаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа и аланинаминотрансфераза, центрилобулярная дегенерация и некроз, и активация купферовских клеток (Trepicchio WL et al., *Toxicol Pathol.* 2001; 29(2):242-9).

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению для применения в способах лечения/предотвращения повреждения почек, например, острого повреждения почек (ОПП; острая почечная недостаточность), или заболевания/расстройства, ассоциированного с повреждением почек. Повреждение почек может быть охарактеризовано повреждением канальцевых эпителиальных клеток (ТЕС) и/или переходом ТЕС от эпителиального к мезенхимально-подобному фенотипу (т.е. ЕМТ). Переход ТЕС к мезенхимально-подобному фенотипу может характеризоваться, например, пониженной экспрессией Е-кадгерина, повышенной экспрессией SNAIL и/или повышенной экспрессией АСТА2. Указанное повреждение почек может иметь любую причину, примеры включают повреждение почек в результате механического (т.е. физического) поражения или повреждения, химического поражения или повреждения, ишемии или генетической предрасположенности. Обычно указанная причина или повреждение приводит к нарушению функции почек, что может приводить к почечной недостаточности. Механическое поражение или повреждение может включать физическое повреждение организма субъекта, почки, ТЕС или подоцитов. Оно может также включать канальцевую обструкцию/блокаду, например, мочевыводящих путей. Согласно некоторым вариантам реализации указанное повреждение почек представляет собой лекарственно-индуцированное повреждение почек или лекарственно-индуцированное острое повреждение почек.

Ишемическое повреждение может возникать в результате снижения кровотока в почку, которое может быть вызвано рядом факторов, например, низким кровяным давлением, например, из-за сепсиса, кровопотери или хирургической операции, или представляет собой эффект химического агента, например, лекарственного препарата или лекарственного средства, введенного субъекту для лечения другого заболевания, расстройства или состояния. Повреждение почек, вызванное ишемией, может представлять собой индуцированное ишемией повреждение почек, или индуцированное ишемией острое повреждение почек. Повреждение почек, вызванное травмой с размождением, может представлять собой индуцированное ишемией повреждение почек с вазоконстрикцией или может быть вызвано механическими факторами с появлением канальцевых цилиндров или токсическими эффектами циркулирующих факторов, например, миоглобина.

Согласно некоторым вариантам реализации повреждение почек, которое может представлять собой ОПП, характеризуется повреждением, в которое могут в некоторых случаях быть вовлечены канальцевые эпителиальные клетки (ТЕС) почек, т.е. почечные канальцевые эпителиальные клетки, или повреждением, которое может приводить к смерти указанных клеток. Клетки ТЕС могут быть проксимальными или дистальными, и те, и те могут быть повреждены при ОПП, как и подоциты в почечных клубочках. Поражение ТЕС может также быть представлено повреждением, поражением или травмой любого типа, например, согласно описанию выше оно может быть представлено механическим, химическим или ишемическим повреждением. Поражение ТЕС представляет собой распространенный причинный фактор повреждения почек, в частности, ОПП. Пролиферация ТЕС обеспечивает механизм восстановления и возобновления функции почек, тогда как неспособность ТЕС к пролиферации может приводить к развитию и прогрессированию заболевания, например, к хронической болезни почек и почечной недостаточности. Может также происходить пролиферация предшественников подоцитов для восстановления

функции клубочков, однако она не настолько хорошо описана, как пролиферация ТЕС. Механическое повреждение может включать, например, одностороннюю обструкцию мочеточника (UUO).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное повреждение почек представляет собой нефротоксичность, то есть токсичность для почек. Нефротоксичность может возникать в результате токсических эффектов определенных веществ на функцию почек, и может, соответственно, рассматриваться как следствие химического поражения или повреждения. В случае химического поражения или повреждения нефротоксичность может представлять собой побочный эффект введения агента для лечения заболевания или состояния, не затрагивающего почки, или затрагивающего как почку, так и одну или более других тканей. Согласно некоторым вариантам реализации нефротоксичность может представлять собой побочный эффект введения химиотерапевтического агента субъекту для предотвращения или лечения рака. Соответственно, нефротоксичность может представлять собой форму лекарственно-индуцированного повреждения почек или лекарственно-индуцированного острого повреждения почек. Согласно некоторым вариантам реализации повреждение почек может быть индуцировано фолиевой кислотой, т.е. представляет собой индуцированное фолатами повреждение почек.

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы для применения в диагностике, лечении и/или профилактике цисплатин-индуцированного повреждения почек. Указанное повреждение может включать цисплатин-индуцированное острое повреждение почек или цисплатин-индуцированную нефротоксичность. Цисплатин (дихлордиаминоплатина; SP-4-2)-диаминдихлорплатина (II) представляет собой химиотерапевтический агент, широко используемый для лечения рака, в том числе рака головы и шеи, молочной железы, легкого, семенников, яичников, головного мозга и мочевого пузыря, и хорошо известно, что он приводит к повреждению почек и дисфункции, включающим повреждение и некроз канальцев (например, Oh et al., *Electrolyte Blood Press* 2014 Dec; 12(2): 55-65; RA Arunkumar et al., *Asian Pac J Trop Biomed* 2012 Aug 2(8): 640-644). Другие химиотерапевтические агенты на основе платины также вызывают повреждение почек.

Известно, что у субъекта с повреждением почек может также наблюдаться фиброз почек, либо как болезненное состояние с отдельной этиологией, либо как вторичный эффект повреждения почек. Согласно некоторым вариантам реализации повреждение почек, которое диагностируют, лечат или предотвращают, не является фиброзом почек, например, ренальным фиброзом. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта нет фиброза. Согласно некоторым вариантам реализации повреждение ТЕС происходит в отсутствие фиброза. Согласно некоторым вариантам реализации фиброз возникает отдельно от ОПП (например, является вторичным относительно ОПП), например, в результате неполной регенерации клеток ТЕС. Согласно некоторым вариантам реализации поврежденные ТЕС у субъекта не являются профибротическими ТЕС. Согласно некоторым вариантам реализации фиброз не возникает.

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению для применения в способах лечения/предотвращения заболевания/расстройства, ассоциированного с инфекцией, в частности, если инфекция прямо или непрямо приводит к фиброзу, раку или воспалению. Заболевание, ассоциированное с инфекцией, может представлять собой заболевание, вызванное или усугубляемое инфекцией релевантным инфекционным агентом, или может представлять собой заболевание, фактором риска которого является инфекция релевантным инфекционным агентом.

Инфекция может представлять собой любую инфекцию или инфекционное заболевание, например, бактериальную, вирусную, микотическую или паразитарную инфекцию. Согласно конкретным вариантам реализации указанное заболевание/расстройство может быть ассоциировано с вирусной инфекцией. Согласно некоторым вариантам реализации может быть, в частности, желательным лечение хронических/персистирующих инфекций, например, если такие инфекции ассоциированы с воспалением, раком и/или фиброзом.

Указанная инфекция может быть хронической, персистирующей, латентной или медленной, и может быть результатом бактериальной, вирусной, микотической или паразитарной инфекции. Соответственно, лечение может быть обеспечено пациентам с бактериальной, вирусной или микотической инфекцией. Примеры бактериальных инфекций включают инфекцию *Helicobacter pylori* и инфекцию легкого *Mycobacterium tuberculosis*. Примеры вирусных инфекций включают инфекцию EBV, HPV, HIV, гепатита В или гепатита С.

Лечение может включать облегчение, лечение или предотвращение любого заболевания/расстройства/состояния, ассоциированного с передачей сигналов ИЛ-11 и/или описанного в настоящем документе путем ингибирования биологической активности ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11R α . Лечение может включать обеспечение обращения или регресса указанного заболевания/расстройства путем ингибирования биологической активности ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11. Такие способы могут включать введение антител/фрагментов/композиций в соответствии с настоящим изобретением для связывания и ингибирования биологической активности ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11. В настоящем документе ингибирование биологической активности ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, может быть названо "нейтрализацией".

Способы лечения могут необязательно включать совместное введение биологических адъювантов

(например, интерлейкинов, цитокинов, бациллы Кальметта-Герена, монофосфорил-липида А и т.п.) в комбинации со стандартными вариантами терапии для лечения рака, такими как лечение агентом для лечения рака (например, химиотерапия), радиация или хирургические вмешательства. Способы медицинского лечения могут также включать *in vivo*, *ex vivo* и адаптивную иммунотерапию, в том числе с применением аутологичных и/или гетерологичных клеток или иммортализованных линий клеток.

Лечение может быть направлено на предотвращение заболевания/расстройства, ассоциированного с избыточно активной/повышенной опосредованной ИЛ-11 передачей сигналов. Соответственно, указанные антитела, антигенсвязывающие фрагменты и полипептиды могут применяться для приготовления фармацевтических композиций или лекарственных средств, и субъекты могут получать профилактическое лечение против развития болезненного состояния. Указанное лечение может проводиться до начала проявления симптомов болезненного состояния, и/или может быть проводиться у субъектов, которых считают подверженными большому риску развития указанного заболевания или расстройства.

Введение агента в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой введение "терапевтически эффективного" или "профилактически эффективного" количества, то есть достаточного для обеспечения наблюдаемого преимущества для субъекта. Фактическое вводимое количество, скорость и порядок введения во времени зависят от природы и тяжести заболевания/состояния и природы агента. Назначение лечения, например, выбор дозировок и т.п., входит в компетенцию терапевтов и других врачей, и, как правило, производится с учетом заболевания/состояния, подлежащего лечению, состояния конкретного субъекта, участка введения, способа введения и других факторов, известных практикующим специалистам. Примеры методик и протоколов, упомянутых выше, можно найти в руководстве: Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

Антигенсвязывающие молекулы, полипептиды, CAR, нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы, клетки и композиции, описанные в настоящем документе, предпочтительно вводят в состав лекарственного средства или фармацевтического средства совместно с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, фармацевтически приемлемыми носителями, адъювантами, вспомогательными веществами, разбавителями, наполнителями, буферами, консервантами, антиоксидантами, смазывающими веществами, стабилизаторами, солюбилизаторами, поверхностно-активными веществами (например, смачивающими агентами), маскирующими агентами, красящими агентами, вкусоароматическими агентами и подслащивающими агентами. Термин "фармацевтически приемлемый" в настоящем документе относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, лекарственным формам и т.п., которые, согласно здравой медицинской оценке, подходят для применения в контакте с тканями рассматриваемого субъекта (например, человека), не вызывая избыточной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, соответствуя целесообразному соотношению преимуществ и риска. Все носители, адъюванты, вспомогательные вещества и т.п. должны также быть "приемлемыми" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава. Подходящие носители, адъюванты, вспомогательные вещества и т.п. описаны в стандартных фармацевтических текстах, например, в руководствах: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; и "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2nd edition, 1994.

Могут быть приготовлены составы, подходящие для введения при подлежащем лечению заболевании/состоянии. Например, могут быть приготовлены составы для местного, парентерального, системного, внутривенного, интраартериального, внутримышечного, интратекального, интраокулярного, местного введения в глаз (например, субконъюнктивально, интравитреально, ретробульбарно, интракамерально), интраконъюнктивального, подкожного, перорального или чрескожного маршрутов введения, которые могут включать инъекцию. Агенты согласно настоящему описанию могут быть введены в жидкий или твердый состав. Текучие составы могут быть приготовлены для введения путем инъекции или инфузии в выбранную область организма человека или животного. Инъецируемые составы могут содержать выбранный агент в стерильной или изотонической среде.

Указанные составы могут быть получены с применением любых способов, хорошо известных в области фармацевтики. Такие способы включают этап связывания активного соединения с носителем, который представлен одним или более вспомогательными ингредиентами. В общем случае указанные составы получают путем равномерного тщательного связывания активного соединения с носителями (например, жидкими носителями, тонкодисперсным твердым носителем и т.п.), с последующим приданием формы продукту, при необходимости.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены способы получения фармацевтически полезных композиций, которые могут включать один или более этапов, выбранных из: выделения антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно описанию в настоящем документе; и/или смешивания выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно описанию в настоящем документе с фармацевтически приемлемым носителем, адъювантом, вспомогательным веществом или разбавителем. Например, дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу приготовления состава с лекарственным средством или фармацевтической композицией или получению лекарственного средства или фармацевтической композиции для применения в способе медицинского лече-

ния, при этом указанный способ включает приготовление состава с фармацевтической композицией или лекарственным средством путем смешивания антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно описанию в настоящем документе с фармацевтически приемлемым носителем, адъювантом, вспомогательным веществом или разбавителем.

Может быть обеспечено введение нескольких доз антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или совокупности нуклеиновых кислот), экспрессионного вектора (или совокупности экспрессионных векторов), клетки или композиции. Введение одной или более, или всех доз может сопровождаться одновременным или последовательным введением другого терапевтического агента.

Введение нескольких доз может быть разделено заранее 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 дней или 31 дня, или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. Например, дозы могут вводиться каждые 7, 14, 21 или 28 дней (± 3 , 2 дня или 1 день).

Антигенсвязывающие молекулы, полипептиды, CAR, нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы, клетки и композиции, описанные в настоящем документе, может вводиться по отдельности или в комбинации с другим терапевтическим или профилактическим вмешательством. Такое другое терапевтическое или профилактическое вмешательство может происходить до, во время и/или после терапии, предусмотренной настоящим изобретением, и проведение других терапевтических или профилактических вмешательств может происходить с использованием тех же маршрутов введения, что и при терапии согласно настоящему описанию, или других маршрутов.

Согласно некоторым вариантам реализации введение антигенсвязывающих молекул, полипептидов, CAR, нуклеиновых кислот, экспрессионных векторов, клеток и композиций, описанных в настоящем документе, может сопровождаться введением агента для лечения или предотвращения инфекции (например, антибиотика, противовирусного, противогрибкового или противопаразитарного агента). Согласно некоторым вариантам реализации лечение антителом, антигенсвязывающим фрагментом или композицией согласно настоящему изобретению может сопровождаться введением агента для лечения или предотвращения воспаления (например, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (НПВС). Согласно некоторым вариантам реализации лечение антителом, антигенсвязывающим фрагментом или композицией согласно настоящему изобретению может сопровождаться радиационной терапией (т.е. лечение ионизирующим излучением, например, рентгеновским излучением или гамма-излучением) и/или введением агента для лечения или предотвращения рака (например, химиотерапевтического агента). Согласно некоторым вариантам реализации указанный химиотерапевтический агент представляет собой алкилирующий агент, например, цисплатин. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, антигенсвязывающий фрагмент или композиция согласно настоящему изобретению может вводиться как часть комбинированной терапии вместе с проведением иммунотерапии.

Одновременное введение относится к совместному введению агентов, например, в фармацевтической композиции, содержащей указанные агенты (т.е. в комбинированном составе), или непосредственно одного за другим и, необязательно, с использованием одного и того же маршрута введения, например, в одну и ту же артерию, вену или другой кровеносный сосуд. Согласно определенным вариантам реализации при одновременном введении два или более из указанных агентов могут вводиться с использованием разных маршрутов введения. Согласно некоторым вариантам реализации одновременное введение относится к введению в то же самое время или, например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 36 или 48 ч.

Последовательное введение относится к введению одного или более агентов, за которым через определенный интервал времени следует отдельное введение другого агента. Использование одного и того же маршрута для введения указанных двух агентов не требуется, хотя и предусмотрено согласно некоторым вариантам реализации. Указанный интервал времени может представлять собой любой интервал времени, в том числе часы, дни, недели, месяцы или года. Согласно некоторым вариантам реализации последовательное введение относится к введению, разделенному интервалом времени, равным по меньшей мере 10, 30 мин, 1, 6, 8, 12, 24, 36, 48 ч, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 6 недель, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев или 6 месяцев.

Способы обнаружения

Согласно настоящему изобретению также предложены предметы настоящего изобретения для применения в способах обнаружения, локализации или визуализации ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, или клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11. Антигенсвязывающие молекулы, описанные в настоящем документе, могут применяться в способах, включающих связывание антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или с комплексом, содержащим ИЛ-11. Такие способы могут включать обнаружение связанного комплекса антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или с комплексом, содержащим ИЛ-11.

Обнаружение ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, может подходить для применения в способах диагностики/прогнозирования заболевания/состояния, в которое патологическим образом вовлечены опосредованная ИЛ-11 передача сигналов и/или клетки, экспрессирующие/содержащие ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, для идентификации субъектов, подверженных риску развития таких забо-

леваний/состояний, и/или может подходить для применения в способах предсказания отклика субъекта на терапевтическое вмешательство.

Соответственно, предложен способ, включающий приведение образца, содержащего или предположительно содержащего ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, или клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, в контакт с антигенсвязывающей молекулой согласно описанию в настоящем документе, и обнаружение образования комплекса антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или с комплексом, содержащим ИЛ-11. Также предложен способ, включающий приведение образца, содержащего или предположительно содержащего клетку, экспрессирующую/содержащую ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, в контакт с антигенсвязывающей молекулой согласно описанию в настоящем документе, и обнаружение образования комплекса антигенсвязывающей молекулы и клетки, экспрессирующей/содержащей ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11.

В данной области техники хорошо известны подходящие форматы способов, в том числе иммунологические анализы, такие как сэндвич-анализы, например, ИФА ELISA. Указанные способы могут включать мечение антигенсвязывающей молекулы или мишени (мишеней), или и первого, и второго, детектируемым фрагментом, например, флуоресцентной меткой, фосфоресцирующей меткой, люминесцентной меткой, иммунодетектируемой меткой, радиоактивной меткой, химической, нуклеиновокислотной или ферментативной меткой. Экспрессия ИЛ-11 может быть измерена в иммуногистохимическом исследовании (ИНС), например, образца ткани, полученного путем биопсии. Согласно некоторым вариантам реализации указанная метка может быть выбрана из: радиоактивного нуклеотида, позитронизлучающего радионуклида (например, для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ)), контрастирующего агента для МРТ или флуоресцентной метки.

Методики обнаружения хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть выбраны так, чтобы соответствовать агенту для мечения. Анализ *in vitro* или *in vivo* процессов, опосредованных ИЛ-11, может включать анализ с применением позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), магнитно-резонансной визуализации (MRI) или визуализации флуоресценции, например, путем обнаружения подходящим образом меченых веществ.

Способы такого типа могут лежать в основе способа диагностики заболевания или состояния, требующего обнаружения и или количественного определения ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11. Такие способы могут быть реализованы *in vitro* на образце от субъекта, или после подготовки образца от субъекта. После выбора образца присутствие субъекта для реализации указанного способа *in vitro* диагностики не требуется и, соответственно, указанный способ может представлять собой такой способ, который не используется для организма человека или животного. Согласно некоторым вариантам реализации предложены антигенсвязывающие молекулы, полипептиды, CAR, нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы, клетка или композиции в соответствии с настоящим изобретением для применения в любом способе диагностики, обнаружения или количественного определения, описанном в настоящем документе.

Такие способы могут включать обнаружение или количественное определение ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, или клеток, экспрессирующих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, например, в образце от пациента. Если указанный способ включает количественное определение релевантного фактора, он может дополнительно включать сравнение определенного количества со стандартным или референсным значением в рамках диагностической или прогностической оценки. Другие диагностические/прогностические тесты могут применяться в сочетании с описанными в настоящем документе для повышения точности диагностики или прогнозирования, или для подтверждения результата, полученного с применением тестов, описанных в настоящем документе.

Обнаружение в образце ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, может быть использована для диагностики инфекционного заболевания, аутоиммунного расстройства или ракового состояния у субъекта, диагностики предрасположенности к инфекционному заболеванию, аутоиммунному расстройству или раковому состоянию, или для получения прогноза (прогнозирования) инфекционного заболевания, аутоиммунного расстройства или ракового состояния. Диагностика или прогнозирование может относиться к существующему (ранее диагностированному) инфекционному, воспалительному или аутоиммунному заболеванию/расстройству или раковому состоянию.

При обнаружении повышенного уровня ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, или наличия - или повышенного количества /повышенной доли - клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, в образце, полученном от субъекта, у указанного субъекта может быть диагностировано заболевание/состояние в соответствии с настоящим изобретением, или риск развития такого заболевания/состояния. В таких способах "повышенный" уровень экспрессии или повышенные количество/доля клеток относится к уровню/количеству/доле, превышающим уровень/количество/долю, определенные для подходящего контрольного условия, например, уровень/количество/долю, детектируемые в сопоставимом образце (например, в образце того же вида, например, полученном из той же жидкости, ткани, органа и т.п.), например, в образце, полученном от здорового субъекта.

При обнаружении повышенного уровня ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, или наличия - или повышенного количества/повышенной доли - клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или

комплекс, содержащий ИЛ-11 в образце, полученном от субъекта, для указанного субъекта может быть сделан менее удовлетворительный прогноз по сравнению с субъектом, у которого определен меньший уровень ИЛ-11, или комплекса, содержащего ИЛ-11, или пониженное количество/доля клеток, экспрессирующих/содержащих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, в сопоставимом образце (например, образце того же вида, например, полученном из тех же жидкости, ткани, органа и т.п.).

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены способы выбора/стратификации субъекта для лечения антигенсвязывающими молекулами, полипептидами, CAR, нуклеиновыми кислотами, экспрессионными векторами, клеткой или композициями в соответствии с настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам реализации субъекта выбирают для лечения/предотвращения согласно настоящему изобретению, или идентифицируют как субъекта, у которого такое лечение/предотвращение обеспечит преимущество, на основании обнаружения/количественного определения ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, или клеток, экспрессирующих ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, например, в образце, полученном от указанного субъекта. Уровень ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, в образце от субъекта, может указывать на то, что субъект может отвечать на лечение антигенсвязывающей молекулой или композицией в соответствии с настоящим изобретением. Присутствие значительных уровней ИЛ-11 или комплекса, содержащего ИЛ-11, в образце может быть использовано для выбора субъекта для лечения согласно описанию в настоящем документе. Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут, соответственно, быть использованы для выбора субъекта для лечения с применением нацеленной на ИЛ-11 терапии.

Образец может быть взят из любой ткани или биологической жидкости. Указанный образец может содержать: некоторое количество крови; некоторое количество сыворотки из крови индивидуума, которая может содержать жидкую часть крови, полученную после удаления фибринового сгустка и клеток крови; образец ткани или биоптат; плевральную жидкость; спинномозговую жидкость (CSF); или клетки, выделенные из организма указанного индивидуума; или образец может происходить из чего-либо из перечисленного. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец может быть получен или может происходить из ткани или тканей, пораженных указанным заболеванием/расстройством (например, ткани или тканей, где проявляются симптомы заболевания, или вовлеченных в патогенез указанного заболевания/расстройства).

Способы диагностики или прогнозирования в соответствии с настоящим изобретением могут быть реализованы *in vitro* на образце, полученном от субъекта, или после обработки образца, полученного от субъекта. После взятия образца присутствие пациента для реализации *in vitro* способа диагностики или прогнозирования не требуется, и, соответственно, указанный способ может представлять собой способ, который не используется для организма человека или животного. Термин "*in vitro*" охватывает эксперименты с клетками в культуре, а термин "*in vivo*" охватывает эксперименты на интактных многоклеточных организмах и/или их лечение.

Способы диагностики или прогнозирования согласно настоящему изобретению могут быть реализованы на образцах, полученных от субъекта в нескольких точках времени на протяжении течения заболевания и/или лечения, и могут применяться для мониторинга развития заболевания/состояния с течением времени, например, ответ на лечение, проведенное у субъекта. Определенные в соответствии с указанными способами характеристики могут быть использованы для принятия клинических решений о времени проведения терапии у субъекта и ее виде.

Субъекты

Субъект в соответствии с аспектами изобретения, описанного в настоящем документе, может представлять собой любое животное или человека. Указанный субъект предпочтительно является млекопитающим, более предпочтительно человеком. Указанный субъект может представлять собой не являющееся человеком млекопитающее, однако более предпочтительно является человеком. Указанный субъект может быть мужского или женского пола. Указанный субъект может представлять собой пациента. У субъекта может быть диагностировано заболевание или состояние, требующее лечения (например, рак), может предполагаться наличие такого заболевания/состояния или он может быть подвержен риску развития такого заболевания/состояния или заражения таким заболеванием/состоянием.

Указанный субъект/пациент может страдать заболеванием/расстройством, при котором снижение уровня (т.е. ингибирование или антагонизм) опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов или снижение количества и/или активности клеток, экспрессирующих ИЛ-11R α или комплекс, содержащий ИЛ-11R α , обеспечивает терапевтическое или профилактическое преимущество. Субъект/пациент может страдать заболеванием/расстройством согласно описанию в настоящем документе. У субъекта/пациента может быть диагностировано заболевание/расстройство согласно описанию в настоящем документе, требующее лечения, может предполагаться наличие такого заболевания/расстройства, или он может быть подвержен риску развития такого заболевания/расстройства.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения указанный субъект предпочтительно представляет собой субъекта-человека. Согласно некоторым вариантам реализации субъект, подлежащий лечению в соответствии с терапевтическим или профилактическим способом согласно настоящему изобретению, представляет собой субъекта, страдающего раком или подверженного риску развития рака.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения субъект может быть выбран для лечения в соответствии с указанными способами на основании характеристик, связанных с определенными маркерами такого заболевания/состояния.

Наборы

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, описанным в настоящем документе, предложен набор из частей. Согласно некоторым вариантам реализации указанный набор может включать по меньшей мере один контейнер с заранее заданным количеством антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или их совокупности), экспрессионного вектора (или их совокупности), клетки или композиции, описанных в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный набор может содержать материалы для получения антигенсвязывающей молекулы, полипептида, CAR, нуклеиновой кислоты (или совокупности нуклеиновых кислот), экспрессионного вектора (или совокупности экспрессионных векторов), клетки или композиции, описанных в настоящем документе.

Указанный набор может содержать антигенсвязывающую молекулу, полипептид, CAR, нуклеиновую кислоту (или совокупность нуклеиновых кислот), экспрессионный вектор (или совокупность экспрессионных векторов), клетку или композицию наряду с инструкциями по введению пациенту для лечения указанного заболевания/состояния.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный набор может дополнительно содержать по меньшей мере один контейнер с заранее заданным количеством другого терапевтического агента (например, противомикробного агента или химиотерапевтического агента). Согласно таким вариантам реализации указанный набор может также содержать второе лекарственное средство или фармацевтическую композицию, таким образом, что два лекарственных средства или две фармацевтических композиции могут вводиться одновременно или по отдельности, так, чтобы они обеспечивали комбинированное лечение конкретного заболевания или состояния. Указанный терапевтический агент может также быть введен в состав, подходящий для инъекции или инфузии в опухоль или в кровь.

Идентичность последовательностей

В настоящем документе "идентичность последовательностей" относится к проценту нуклеотидов/остатков аминокислот в рассматриваемой последовательности, идентичных нуклеотидам/остаткам аминокислот в референсной последовательности, после выравнивания указанной последовательности и, при необходимости, введения пропусков для достижения максимального процента идентичности указанных последовательностей. Парное выравнивание и выравнивание нескольких последовательностей для определения процента идентичности двух или более последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот может осуществляться различными путями, известными специалисту в данной области техники, например, с применением компьютерного программного обеспечения в открытом доступе, такого как 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 применяют установленные по умолчанию параметры, например, для штрафа за пропуск в последовательности и штрафа за продолжение пропуска.

14	01I VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCISYAGSYTWVFGGGTKLTVLG
15	01L VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCLSYAGSYTWVFGGGTKLTVLG
16	01Q VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYAGSYTWVFGGGTKLTVLG
17	01S VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSYTWVFGGGTKLTVLG
18	01T VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYAGSYTWVFGGGTKLTVLG
19	01V VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGSYTWVFGGGTKLTVLG
20	02A VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
21	02G VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGSYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
22	02I VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCISYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
23	02L VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCLSYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
24	02Q VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
25	02S VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
26	02T VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
27	02V VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGRYTWMFGGGTKVTVLG
28	03A VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVTKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGSYTWVFGGGTQLTVLG
29	03G VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVTKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCGSYAGSYTWVFGGGTQLTVLG
30	03I VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVTKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCISYAGSYTWVFGGGTQLTVLG
31	03L VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVTKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCLSYAGSYTWVFGGGTQLTVLG
32	03Q VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVTKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYAGSYTWVFGGGTQLTVLG
33	03S VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVTKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSYTWVFGGGTQLTVLG
34	03T VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVTKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYAGSYTWVFGGGTQLTVLG
35	03V VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVTKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGSYTWVFGGGTQLTVLG
36	YU100-H01 HC-CDR1	SYAMH
37	YU100-G08, YU100-F11 HC-CDR1	SYGMH
38	YU100-H01 YU100-G08 YU100-F11 HC-CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG
39	YU100-H01 HC-CDR3	IMGYDYG DYDVVDY
40	YU100-G08, YU100-F11 HC-CDR3	IGATDPLDY

41	YU100-H01, 01A, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01T, 01V LC-CDR1	TGTSSDVGAYNYVS
42	YU100-G08, 02A, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02T, 02V LC-CDR1	TGTSSDVGGYNYVS
43	YU100-F11, 03A, 03G, 03I, 03L, 03Q, 03S, 03T, 03V LC-CDR1	TGSSSDVAGYNYVS
44	YU100-H01, 01A, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01T, 01V LC-CDR2	DVSRPS
45	YU100-G08, 02A, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02T, 02V LC-CDR2	DVNERSS
46	YU100-F11, 03A, 03G, 03I, 03L, 03Q, 03S, 03T, 03V LC-CDR2	DVTKRPS
47	YU100-H01, YU100-F11 LC-CDR3	CSYAGSYTWV
48	01A, 03A, LC-CDR3	ASYAGSYTWV
49	01G, 03G LC-CDR3	GSYAGSYTWV
50	01I, 03I LC-CDR3	ISYAGSYTWV
51	01L, 03L LC-CDR3	LSYAGSYTWV
52	01Q, 03Q LC-CDR3	QSYAGSYTWV
53	01S, 03S LC-CDR3	SSYAGSYTWV
54	01T, 03T LC-CDR3	TSYAGSYTWV
55	01V, 03V LC-CDR3	VSYAGSYTWV
56	YU100-G08 LC-CDR3	CSYAGRYTWM
57	02A LC-CDR3	ASYAGRYTWM
58	02G LC-CDR3	GSYAGRYTWM
59	02I LC-CDR3	ISYAGRYTWM
60	02L LC-CDR3	LSYAGRYTWM
61	02Q LC-CDR3	QSYAGRYTWM
62	02S LC-CDR3	SSYAGRYTWM
63	02T	TSYAGRYTWM

048010

	LC-CDR3	
64	02V LC-CDR3	VSYAGRYTWM
65	YU100-H01, YU100-G08 HC-FR1	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFS
66	YU100-F11 HC-FR1	QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFS
67	YU100-H01 YU100-G08 YU100-F11 HC-FR2	WVRQAPGKGLEWVA
68	YU100-H01 HC-FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
69	YU100-G08, YU100-F11 HC-FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
70	YU100-H01 YU100-G08 YU100-F11 HC-FR4	WGQGTLVTVSS
71	YU100-H01, 01A, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01T, 01V LC-FR1	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC
72	YU100-G08, 02A, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02T, 02V LC-FR1	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLSC
73	YU100-F11, 03A, 03G, 03I, 03L, 03Q, 03S, 03T, 03V LC-FR1	QSALTQPASVSGSPGQSITISC
74	YU100-H01, 01A, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01T, 01V, YU100-F11, 03A, 03G, 03I, 03L, 03Q, 03S, 03T, 03V LC-FR2	WYQQHPGKAPKLMY
75	YU100-G08, 02A, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02T, 02V LC-FR2	WYQHYPGKAPKLMIF
76	YU100-H01, 01A, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01T, 01V, YU100-G08, 02A, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02T, 02V, YU100- F11, 03A, 03G, 03I, 03L, 03Q, 03S, 03T, 03V LC-FR3	GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDAADYYC
77	YU100-H01, 01A,	FGGGTKLTVLG

	01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01T, 01V LC-FR4	
78	YU100-G08, 02A, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02T, 02V LC-FR4	FGGGTKVTVLG
79	YU100-F11, 03A, 03G, 03I, 03L, 03Q, 03S, 03T, 03V LC-FR4	FGGGTQLTVLG
80	01X 03X LC-CDR3	X ₁ SYAGSYTWV X ₁ = A, G, I, L, Q, S, T или V
81	02X LC-CDR3	X ₁ SYAGRYTWM X ₁ = A, G, I, L, Q, S, T или V
82	01X VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSERPSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCX ₁ SYAGSYTWVFGGGTKLTVLG X ₁ = A, G, I, L, Q, S, T или V
83	02X VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSG VPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCX ₁ SYAGRYTWMFGGGTKVTVLG X ₁ = A, G, I, L, Q, S, T или V
84	03X VL	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVAGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCX ₁ SYAGSYTWVFGGGTQLTVLG X ₁ = A, G, I, L, Q, S, T или V
85	Константная область IgG1 человека (IGHG1; UniProt:P01857-1, v1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSK RWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	CH1 IgG1 (положения 1–98 из P01857-1, v1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
87	Шарнир IgG1 (положения 99– 110 из P01857-1, v1)	EPKSCDKTHTCP
88	CH2 IgG1 (положения 111– 223 из P01857-1, v1)	PCPAPFII.GGPSVFI.FPPKPKDTI.MISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
89	CH3 IgG1 (положения 224– 330 из P01857-1, v1)	GQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	Ск CL (IGCK; UniProt: P01834-1, v2)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
91	3C6 VH 1	QVQLQESGPVELVKPGASVKIPCKASGYFTFDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPHNGGPI YNQKFTGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWGTGTTVTV SS
92	3C6 VH 2	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYFTFDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPHNGGPI YNQKFTGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWGTGTTVTV SS
93	3C6 VL 1	NIVMTQSPKSMSVGERVTLTCKASENVVTVVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGGQYSYPYTFGGGKLEIK
94	3C6 VL 2	DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYIHWWYQQKPGQPPKLLIYLASNLDG VPAFSGSGSDFTLNIIHPVEEEDAATYYCQHSRDLPTTFGGGKLEIK

95	3C6 VH 1, 3C6 VH 2, 3C6 VH 2.1, 3C6 VH 2.2, 3C6 VH 2.3, 3C6 VH 2.4, 3C6 VH 2.5 HC-CDR1	DYNMD
96	3C6 VH 1, 3C6 VH 2, 3C6 VH 2.1, 3C6 VH 2.2, 3C6 VH 2.3, 3C6 VH 2.4, 3C6 VH 2.5 HC-CDR2	DINPHNGGPIYNQKFTG
97	3C6 VH 1, 3C6 VH 2, 3C6 VH 2.1, 3C6 VH 2.2, 3C6 VH 2.3, 3C6 VH 2.4, 3C6 VH 2.5 HC-CDR3	GELGHWYFDV
98	3C6 VL 1 3C6 VL 1.1, 3C6 VL 1.2, 3C6 VL 1.3, 3C6 VL 1.4 LC-CDR1	KASENVVITYVS
99	3C6 VL 1 3C6 VL 1.1, 3C6 VL 1.2, 3C6 VL 1.3, 3C6 VL 1.4 LC-CDR2	GASNRYT
100	3C6 VL 1, 3C6 VL 1.1, 3C6 VL 1.2, 3C6 VL 1.3, 3C6 VL 1.4 LC-CDR3	GQGYSYPYT
101	3C6 VL 2, 3C6 VL 2.1, 3C6 VL 2.2, 3C6 VL 2.3, 3C6 VL 2.4 LC-CDR1	RASKSVSTSGYSYIH
102	3C6 VL 2, 3C6 VL 2.1, 3C6 VL 2.2, 3C6 VL 2.3, 3C6 VL 2.4 LC-CDR2	LASNLDS
103	3C6 VL 2, 3C6 VL 2.1, 3C6 VL 2.2, 3C6 VL 2.3, 3C6 VL 2.4	QHSRDLPT

	LC-CDR3	
104	3C6 VH 1 HC-FR1	QVQLQESGPELVKPGASVKIPCKASGYTFT
105	3C6 VH 2 HC-FR1	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFT
106	3C6 VH 1, 3C6 VH 2 HC-FR2	WVKQSHGKSLEWIG
107	3C6 VH 1, 3C6 VH 2 HC-FR3	KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCAR
108	3C6 VH 1, 3C6 VH 2 HC-FR4	WGTGTTVTVSS
109	3C6 VL 1 LC-FR1	NIVMTQSPKSMSVGERVTLTC
110	3C6 VL 2 LC-FR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC
111	3C6 VL 1 LC-FR2	WYQQKPEQSPKLLIY
112	3C6 VL 2, 3C6 VL 1.1, 3C6 VL 1.2, 3C6 VL 1.3, 3C6 VL 1.4LC-FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
113	3C6 VL 1 LC-FR3	GVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHC
114	3C6 VL 2 LC-FR3	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC
115	3C6 VL 1, 3C6 VL 2 LC-FR4	FGGGTKLEIK
116	3C6 VH 2.1	EVQLVQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVKQAHGQRLEWIGDINPHNGGPI YNQKFTGRATLTVDKSASTAYMELRSLTSEDVAVYYCARGELGHWYFDVWGQGTTVT VSS
117	3C6 VH 2.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVKQAPGQRLEWIGDINPHNGGPI YNQKFTGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGELGHWYFDVWGQGTTVT VSS
118	3C6 VH 2.3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVRQAPGQRLEWIGDINPHNGGPI YNQKFTGRVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGELGHWYFDVWGQGTTVT VSS
119	3C6 VH 2.4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMDWVRQAPGQRLEWIGDINPHNGG PIYNQKFTGRVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGELGHWYFDVWGQGTTVT TVSS
120	3C6 VH 2.5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMDWVRQAPGQRLEWIGDINPHNG GPIYNQKFTGRVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGELGHWYFDVWGQGT TVSS
121	3C6 VL 2.1	DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYIHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLD SGV VPARFSGSGSGTDFTLNIHPLEEDFATYYCQHSRDLPPTFGGQGTKLEIK
122	3C6 VL 2.2	DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYIHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLD SGV VPARFSGSGSGTDFTLTISSLEEDFATYYCQHSRDLPPTFGGQGTKLEIK
123	3C6 VL 2.3	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYIHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLD SGV VPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQHSRDLPPTFGGQGTKLEIK
124	3C6 VL 2.4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYIHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLD SGV VPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQHSRDLPPTFGGQGTKLEIK
125	3C6 VL 1.1	NIVMTQSPDLSVSVGERATLNCKASENVVTVVSWYQQKPGQPPKLLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISSLQAEDLADYHCGQGYSPYTFGGQGTKLEIK

126	3C6 VL 1.2	NIVMTQSPDSLAVSVGERATLNCKASENVVTTYVSWYQKPGQPPELLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISSLQAEDLADYHCGQGYSPYTFGQGTKLEIK
127	3C6 VL 1.3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASENVVTTYVSWYQKPGQPPELLIYGASNRYTGVP DRFSGSGSATDFTLTISSLQAEDLADYHCGQGYSPYTFGQGTKLEIK
128	3C6 VL 1.4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASENVVTTYVSWYQKPGQPPELLIYGASNRYTGVP DRFSGSGSATDFTLTISSLQAEDVAVYHCGQGYSPYTFGQGTKLEIK
129	3C6 VH 2.1 HC-FR1	EVQLVQSGPELKKPGASVKISCKASGYTFT
130	3C6 VH 2.2, 3C6 VH 2.3 HC-FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFT
131	3C6 VH 2.4, 3C6 VH 2.5 HC-FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT
132	3C6 VH 2.1 HC-FR2	WVKQAHGQRLEWIG
133	3C6 VH 2.2 HC-FR2	WVKQAPGQRLEWIG
134	3C6 VH 2.3, 3C6 VH 2.4 HC-FR2	WVRQAPGQRLEWIG
135	3C6 VH 2.5 HC-FR2	WVRQAPGQRLEWMG
136	3C6 VH 2.1 HC-FR3	RATLTVDKSASTAYMELRSLTSEDVAVYYCAR
137	3C6 VH 2.2 HC-FR3	RATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
138	3C6 VH 2.3 HC-FR3	RVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
139	3C6 VH 2.4, 3C6 VH 2.5 HC-FR3	RVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
140	3C6 VH 2.1, 3C6 VH 2.2, 3C6 VH 2.3, 3C6 VH 2.4, 3C6 VH 2.5 HC-FR4	WGQGTTVTVSS
141	3C6 VL 2.1, 3C6 VL 2.2 LC-FR1	DIVLTQSPASLALSPGERATLSC
142	3C6 VL 2.3 LC-FR1	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
143	3C6 VL 2.4 LC-FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
144	3C6 VL 2.1 LC-FR2	WYQQKPGQPPELLIY
145	3C6 VL 2.2, 3C6 VL 2.3, 3C6 VL 2.4 LC-FR2	WYQQKPGQAPPELLIY
146	3C6 VL 2.1 LC-FR3	GVPARFSGSGGTDFTLNIHPLEEEDFATYYC
147	3C6 VL 2.2 LC-FR3	GVPARFSGSGGTDFTLTISSLEEDFATYYC
148	3C6 VL 2.3, 3C6 VL 2.4 LC-FR3	GVPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFATYYC

149	3C6 VL 2.1 3C6 VL 2.2 3C6 VL 2.3 3C6 VL 2.4 3C6 VL 1.1 3C6 VL 1.2 3C6 VL 1.3 3C6 VL 1.4 LC-FR4	FGQGTKLEIK
150	3C6 VL 1.1 LC-FR1	NIVMTQSPDLSVSVGERATLNC
151	3C6 VL 1.2 LC-FR1	NIVMTQSPDSLAVSVGERATLNC
152	3C6 VL 1.3, 3C6 VL 1.4 LC-FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
153	3C6 VL 1.1 3C6 VL 1.2 LC-FR3	GVPDRFTGSGSATDFTLTISSLQAEDLADYHC
154	3C6 VL 1.3 LC-FR3	GVPDRFSGSGSATDFTLTISSLQAEDLADYHC
155	3C6 VL 1.4 LC-FR3	GVPDRFSGSGSATDFTLTISSLQAEDVAVYHC
156	1H2 VH	QAQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGITWVKQRTGQGLEWIGDIYPRSGNIY YNENFKGEATLTADKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARSGWEGWFAYWGQGLVTVS V
157	1H2 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVGSVAVVWYQKPGQSPKVLIIYWASTRHTGV PDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYRTFGGGTKLEIK
158	1H2 HC-CDR1	SYGIT
159	1H2 HC-CDR2	DIYPRSGNIYYNENFKG
160	1H2 HC-CDR3	SGWEGWFAY
161	1H2 LC-CDR1	KASQDVGSVAVV
162	1H2 LC-CDR2	WASTRHT
163	1H2 LC-CDR3	QQYSSYRT
164	1H2 HC-FR1	QAQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFT
165	1H2 HC-FR2	WVKQRTGQGLEWIG
166	1H2 HC-FR3	EATLTADKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR
167	1H2 HC-FR4	WGQGLVTVSV
168	1H2 LC-FR1	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITC
169	1H2 LC-FR2	WYQKPGQSPKVLIIY
170	1H2 LC-FR3	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC
171	1H2 LC-FR4	FGGGTKLEIK
172	1H2 VH	CAGGCTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAG CTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATGGTATAACCTGGGTGAAG

		CAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTTATCCTAGAAGTGGTAAT ATTTATTACAATGAGAATTCAAGGGCGAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCC AGCACAGCCTATATGCAGCTCAGCAGACTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTT TGTGCAAGATCCGGTGGGAAGGCTGGTTTGTCTATTGGGGCCAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGTA
173	IH2 VL	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTC AACATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTAGTGCTGTAGTCTGGTATCAACAG AAACCAGGGCAATCTCTAAAGTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGA GTCCCTGATCGTTTACAGGCAGTGGCTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCA ATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTGCAATATAGCAGTTATCGGA CGTTTCGGTGGAGGCCAAGCTGGAATCAAA
174	7D4 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVKQSQGRLEWIGDINPNYGGTI YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTTVYYCTRGELGHWFYFDVWGTGTTVTV SS
175	7D4 VL	DIVLTQSPPSLTVSLGQRATISCRASKSVSASGYSYMHWYQKPGQPPKLLIYLTNSLESG VPARFSGSGSDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSWDLPTTFGGGKLEIK
176	7D4 HC-CDR1	DYNMD
177	7D4 HC-CDR2	DINPNYGGTIYNQKFKG
178	7D4 HC-CDR3	GELGHWFYFDV
179	7D4 LC-CDR1	RASKSVSASGYSYMH
180	7D4 LC-CDR2	LTSNLES
181	7D4 LC-CDR3	QHSWDLPT
182	7D4 HC-FR1	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT
183	7D4 HC-FR2	WVKQSQGRLEWIG
184	7D4 HC-FR3	KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTTVYYCTR
185	7D4 HC-FR4	WGTGTTVTVSS
186	7D4 LC-FR1	DIVLTQSPPSLTVSLGQRATISC
187	7D4 LC-FR2	WYQKPGQPPKLLIY
188	7D4 LC-FR3	GVPARFSGSGSDFTLNIHPVEEEDAATYYC
189	7D4 LC-FR4	FGGGKLEIK
190	7D4 VH	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG ATATCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACAACATGGACTGGGTGAAG CAGAGTCAAGGAAAGAGACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAACTATGGTGGT ACTATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCCTCC AGCACAGCCTACATGGAGCTCCGACGCTGACATCTGAGGACACTACAGTCTATTAC TGTACAAGAGGGGAACCTGGGTCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCAG GTCACCGTCTCCTCA
191	7D4 VL	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTCCTTAACTGTGTCTCTGGGGCAGAGGGCCA CCATCTCATGCAGGGCCAGTAAAAGTGTCAAGTGCAGTGCCTCTGGCTATAGTTATATGCACT GGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCTTACATCCAACC TAGAATCTGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAACC TCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTACACAGTT GGGACCTTCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCCAAGCTGGAATCAAA

192	8H11 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNIDWVKQSHGKSLEWIGDINPNYGGTL YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCARGELGHWYFDVWGTGTTVT VSS
193	8H11 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSDYSYMHWYQQKPGHPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYFCQHSRDLPTFGGGTKLEIK
194	8H11 HC-CDR1	DYNID
195	8H11 HC-CDR2	DINPNYGGTLYNQKFKG
196	8H11 HC-CDR3	GELGHWYFDV
197	8H11 LC-CDR1	RASKSVSTSDYSYMH
198	8H11 LC-CDR2	LASNLES
199	8H11 LC-CDR3	QHSRDLPT
200	8H11 HC-FR1	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFT
201	8H11 HC-FR2	WVKQSHGKSLEWIG
202	8H11 HC-FR3	KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCAR
203	8H11 HC-FR4	WGTGTTVTVSS
204	8H11 LC-FR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC
205	8H11 LC-FR2	WYQQKPGHPPKLLIY
206	8H11 LC-FR3	GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYFC
207	8H11 LC-FR4	FGGGTKLEIK
208	8H11 VH	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAG ATACCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACAACATAGACTGGGTGAAG CAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATTATGGTGGT ACTCTCTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCAACATTGACTGTAGACAAGTCTCC AGCACAGCCTACATGGAACCTCCGACGCTGACATCTGAGGACACTGCAGTCTATTAC TGTGCAAGAGGGGAACCTGGTCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACG GTCACCGTCTCTCA
209	8H11 VL	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCA CCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGACTATAGTTATATGCACT GGTACCAACAGAAACCAGGACACCCACCCAAACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACC TAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAACC TCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTTCTGTGCACACAGTA GGGACCTTCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCCAACAGCTGGAATCAAA
210	YU100-G08 VH- 02A VL	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGATDPLDYWGQGLVTV SSGSASAPKLEEGEFSEARVQSALTQPRSVSGSPGQSVTLSTGTSSDVGGYNYVSWYQH YPGKAPKLMIFDVNERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTW MFGGGTKVTVLGPKAAPSVTLFPPS
211	Константная область IgG4 человка (IGHG4; UniProt: P01861, v1)	ASTRGPSVFPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMIHALHNHYTQKLSLSLGLK

212	CH1 IgG4 (положения 1–98 P01861, v1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV
213	Шарнир IgG4 (положения 99– 110 P01861, v1)	ESKYGPPCPSCP
214	CH2 IgG4 (положения 111– 220 P01861, v1)	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
215	CH3 IgG4 (положения 221– 327 P01861, v1)	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLGK
216	Константная область IgG4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1; S241P)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLGK
217	Шарнир IgG4 (положения 99– 110 P01861, v1; S241P)	ESKYGPPCPSCP
218	Константная область IgG4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1; S241P и L248E)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLGK
219	CH2 IgG4 (положения 111– 220 P01861, v1; L248E)	APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
220	YU100-G08 VH - константная область IgG1 человека (IGHG1; UniProt:P01857-1, v1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGATDPLDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYICNVNHPKPSNTKVDKRVESKCDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
221	YU100-G08 VH - константная область IgG4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGATDPLDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLGK
222	YU100-G08 VH - константная область IgG4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1; S241P)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGATDPLDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLGK
223	YU100-G08 VH - константная область IgG4	QVQLVQSGGGVVPGRSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGATDPLDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

	человка (IGHG4; UniProt: P01861, v1; S241P и L248E)	SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLGK
224	02A VL-C _κ CL (IGCK; UniProt: P01834-1, v2)	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLSTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGKTKVTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
225	3C6 VH 2.2 - константная область IgG1 человека (IGHG1; UniProt: P01857-1, v1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNMMDVWKQAPGQRLEWIGDINPHNGGPIYNQKFTGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWVGQGTVTYVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYKSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK
226	3C6 VH 2.2 - константная область IgG4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNMMDVWKQAPGQRLEWIGDINPHNGGPIYNQKFTGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWVGQGTVTYVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLGK
227	3C6 VH 2.2 - константная область IgG4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1; S241P)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNMMDVWKQAPGQRLEWIGDINPHNGGPIYNQKFTGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWVGQGTVTYVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLGK
228	3C6 VH 2.2 - константная область IgG4 человека (IGHG4; UniProt: P01861, v1; S241P и L248E)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNMMDVWKQAPGQRLEWIGDINPHNGGPIYNQKFTGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGELGHWYFDVWVGQGTVTYVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLGK
229	3C6 VL 2.2 - C _κ CL (IGCK; UniProt: P01834-1, v2)	DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYIHWHYQKPGQAPRLLIYLASNLDGSPVDFRFGSGSGTDFTLNIHPLLEEDFATYYCQHSRDLPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
230	3C6 VL 2.1 - C _κ CL (IGCK; UniProt: P01834-1, v2)	DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYIHWHYQKPGQAPRLLIYLASNLDGSPVDFRFGSGSGTDFTLNIHPLLEEDFATYYCQHSRDLPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
231	C _λ CL (IGLC1; UniProt: P0CG04, v1)	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
232	C _λ CL (IGLC2; UniProt: P0DOY2, v1)	GQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
233	C _λ CL (IGLC3; UniProt: P0DOY3, v1)	GQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
234	C _λ CL (IGLC6; UniProt: P0CF74, v1)	GQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVNTGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS
235	C _λ CL (IGLC7; UniProt: A0M8Q6, v3)	GQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFNPGAVTVAWKADGSPVKGVETTTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS
236	02A VL-C _κ CL (IGLC1; UniProt: P0CG04, v1)	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLSTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGKTKVTVLQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
237	02A VL-C _κ CL (IGLC2; UniProt: P0DOY2, v1))	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLSTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGKTKVTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
238	02A VL-C _κ CL (IGLC3; UniProt: P0DOY3, v1)	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLSTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGKTKVTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
239	02A VL-C _κ CL (IGLC6; UniProt: P0CF74, v1)	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLSTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGKTKVTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVNTGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS
240	02A VL-C _κ CL (IGLC7; UniProt: A0M8Q6, v3)	QSALTQPRSVSGSPGQSVTLSTGTSSDVGGYNYVSWYQHYPGKAPKLMIFDVNERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYAGRYTWMFGGGKTKVTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFNPGAVTVAWKADGSPVKGVETTTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

Пронумерованные параграфы (пункты), относящиеся к аспектам и вариантам реализации настоящего изобретения:

1. Антигенсвязывающая молекула, необязательно выделенная, способная к связыванию с ИЛ-11,

последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 30;

(d)

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 10; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 31;

(e)

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 10; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 32;

(f)

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 10; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 33;

(g)

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 10; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO:34; или

(h)

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO:10; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 35.

15. Антигенсвязывающая молекула, необязательно выделенная, способная связываться с ИЛ-11, которая содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 95

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 96

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 97; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 98 или 101

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 99 или 102

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 100 или 103.

16. Антигенсвязывающая молекула в соответствии с п.15, которая содержит:

(a)

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 95

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 96

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 97; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 98

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 99

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 100; или

(b)

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 95

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 96

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 97; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 101

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 102

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 103.

17. Антигенсвязывающая молекула в соответствии с п.15 или 16, которая содержит

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 91, 92, 116, 117, 118, 119 или 120; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 93, 94, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 или 128.

18. Антигенсвязывающая молекула в соответствии с любым из пп.1-17, способную ингибировать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов.

19. Антигенсвязывающая молекула, необязательно выделенная, содержащая: (i) антигенсвязывающую молекулу в соответствии с любым из пп.1-18, и (ii) антигенсвязывающую молекулу, способную к связыванию с антигеном, который не является ИЛ-11.

20. Антигенсвязывающая молекула в соответствии с любым из пп.1-19, способную ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11, и рецептором ИЛ-11.

21. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающую молекулу в соответствии с любым из пп.1-20.

22. Нуклеиновая кислота или совокупность нуклеиновых кислот, необязательно выделенная, кодирующая антигенсвязывающую молекулу в соответствии с любым из пп.1-20 или CAR в соответствии с п.21.

23. Экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов, содержащий (содержащая) нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот в соответствии с п.22.

24. Клетка, содержащая антигенсвязывающую молекулу в соответствии с любым из пп.1-20, CAR в соответствии с п.21, нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот в соответствии с п.22; или экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов в соответствии с п.23.

25. Способ, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот в соответствии с п.22, или экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов в соответствии с п.23, в условиях, подходящих для экспрессии антигенсвязывающей молекулы или CAR с указанных нуклеиновой кислоты (кислот) или экспрессионного вектора (векторов).

26. Композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу в соответствии с любым из пп.1-20, CAR в соответствии с п.21, нуклеиновую кислоту или совокупность нуклеиновых кислот в соответствии с п.22, экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов в соответствии с п.23; или клетку в соответствии с п.24.

27. Антигенсвязывающая молекула в соответствии с любым из пп.1-20, CAR в соответствии с п.21, нуклеиновая кислота или совокупность нуклеиновых кислот в соответствии с п.22, экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов в соответствии с п.23, клетка в соответствии с п.24 или композиция в соответствии с п.26 для применения в способе медицинского лечения или профилактики.

28. Антигенсвязывающая молекула в соответствии с любым из пп.1-20, CAR в соответствии с п.21, нуклеиновая кислота или совокупность нуклеиновых кислот в соответствии с п.22, экспрессионный вектор или совокупность экспрессионных векторов в соответствии с п.23, клетка в соответствии с п.24 или композиция в соответствии с п.26 для применения в способе лечения или предотвращения фиброза, заболевания, характеризующегося фиброзом, рака, воспаления или заболевания, характеризующегося воспалением.

29. Применение антигенсвязывающей молекулы в соответствии с любым из пп.1-20, CAR в соответствии с п.21, нуклеиновой кислоты или совокупности нуклеиновых кислот в соответствии с п.22, экспрессионного вектора или совокупности экспрессионных векторов в соответствии с п.23, клетки в соответствии с п.24 или композиции в соответствии с п.26 для получения лекарственного средства для применения в способе лечения или предотвращения фиброза, заболевания, характеризующегося фиброзом, рака, воспаления или заболевания, характеризующегося воспалением.

30. Способ лечения или предотвращения фиброза, заболевания, характеризующегося фиброзом, рака, воспаления или заболевания, характеризующегося воспалением, включающий введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества антигенсвязывающей молекулы в соответствии с любым из пп.1-20, CAR в соответствии с п.21, нуклеиновой кислоты или совокупности нуклеиновых кислот в соответствии с п.22, экспрессионного вектора или совокупности экспрессионных векторов в соответствии с п.23, клетки в соответствии с п.24 или композиции в соответствии с п.26.

31. Способ ингибирования передачи сигналов, опосредованной ИЛ-11, включающий приведение экспрессирующих ИЛ-11 клеток в контакт с антигенсвязывающей молекулой в соответствии с любым из пп.1-20.

32. *In vitro* комплекс, необязательно выделенный, содержащий антигенсвязывающую молекулу в соответствии с любым из пп.1-20, связанную с ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11.

33. Способ, включающий приведение образца, содержащего или предположительно содержащего ИЛ-11 или комплекс, содержащий ИЛ-11, в контакт с антигенсвязывающей молекулой в соответствии с любым из пп.1-20, и обнаружение образования комплекса антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11.

34. Способ выбора или стратификации субъекта для лечения направленным на ИЛ-11 агентом, который включает приведение *in vitro* образца от указанного субъекта в контакт с антигенсвязывающей молекулой в соответствии с любым из пп.1-20 и обнаружение образования комплекса антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11.

35. Применение антигенсвязывающей молекулы в соответствии с любым из пп.1-20 в качестве *in vitro* или *in vivo* диагностического или прогностического агента.

36. Набор из частей, содержащий заранее заданное количество: антигенсвязывающей молекулы по

любому из пп.1-20, CAR по п.21, нуклеиновой кислоты или совокупности нуклеиновых кислот по п.22, экспрессионного вектора или совокупности экспрессионных векторов по п.23, клетки по п.24 или композиции по п.26.

Настоящее изобретение включает комбинацию описанных аспектов и предпочтительных признаков, за исключением случаев, когда такая комбинация явно недопустима или явным образом избегается.

Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены исключительно для организационных целей и не должны быть истолкованы как ограничивающие описанный объект изобретения.

Аспекты и варианты реализации настоящего изобретения далее проиллюстрированы, например, с помощью сопроводительных чертежей. Дополнительные аспекты и варианты реализации очевидны для специалистов в данной области техники. Все документы, упоминаемые в настоящем описании, включены в него посредством ссылок.

В тексте настоящего описания, в том числе в формуле изобретения, приведенной ниже, за исключением случаев, когда контекст подразумевает иное, термин "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", подразумевают включение указанного целого числа или этапа, или группы целых чисел или этапов, но не исключение какого-либо другого целого числа или этапа, или группы целых чисел или этапов.

Следует отметить, что в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения термины в единственном числе включают соответствующие термины во множественном числе, если иное явным образом не следует из контекста. Диапазоны в настоящем документе могут быть указаны как "приблизительное" конкретное значение или как диапазон от одного "приблизительного" конкретного значения до другого "приблизительного" конкретного значения. При таком описании диапазона другой вариант реализации включает одно конкретное значение, или диапазон от одного конкретного значения до другого конкретного значения. Аналогичным образом, если значения указаны в виде приблизительных величин с использованием предваряющего термина "приблизительно", следует понимать, что конкретное значение дает другой вариант реализации.

В случаях описания в настоящем документе последовательности нуклеиновой кислоты также явным образом предусмотрен ее обратный комплемент.

Способы, описанные в настоящем документе, предпочтительно могут быть осуществлены *in vitro*. Термин "*in vitro*" охватывает процедуры, которые проводят с клетками в культуре, а термин "*in vivo*" охватывает процедуры с интактными многоклеточными организмами или на них.

Краткое описание чертежей

Ниже описаны варианты реализации и эксперименты, иллюстрирующие принципы настоящего изобретения, со ссылками на прилагаемые чертежи.

Фиг. 1 - таблица с обзорной информацией о стратегиях пэннинга, используемых для идентификации антител человека против ИЛ-11 человека, способных связываться как с ИЛ-11 человека, так и с ИЛ-11 мыши;

фиг. 2 - Диаграмма рассеяния, отражающая силу сигнала связывания с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши по оценке в ИФА ELISA для 86 кандидатных антител человека против ИЛ-11;

фиг. 3 - таблица с обзорной информацией для 56 клонов антитела человека против ИЛ-11;

фиг. 4А и 4В - гистограммы, отражающие ингибирование антителами человека против ИЛ-11 передачи сигналов, опосредованной ИЛ-11, *in vitro* в фибробластах предсердий человека, исходя из кратности изменения процента α SMA-положительных клеток по сравнению с контрольными (нестимулированными) фибробластами, после стимуляции ТФР- β 1 в присутствии антител человека против ИЛ. (4А) Гистограмма, отражающая кратность изменения доли α SMA-положительных клеток по сравнению с нестимулированными клетками (=1). (4В) Гистограмма, отражающая процент α SMA-положительных клеток (активированных фибробластов);

фиг. 5А и 5В - гистограмма, отражающая ингибирование антителами человека против ИЛ-11 опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов, *in vitro* в (5А) фибробластах предсердий мыши и (5В) фибробластах кожи мыши, исходя из кратности изменения процента α -SMA-положительных клеток по сравнению с контрольными (нестимулированными) фибробластами после стимуляции ТФР- β 1 в присутствии антител человека против ИЛ;

фиг. 6 - гистограмма, отражающая ингибирование антителами человека против ИЛ-11 транс-передачи сигналов ИЛ-11, опосредованной гипер-ИЛ-11, *in vitro* в фибробластах предсердий человека, исходя из кратности изменения процента α -SMA-положительных клеток по сравнению с контрольными (нестимулированными) фибробластами после стимуляции гипер-ИЛ-11 в присутствии антител человека против ИЛ-11;

фиг. 7 - таблица с обзорными данными по кратности изменений на фиг. 4-6 для 56 антител человека против ИЛ-11. Кандидатные антитела под номерами 1-56 соответствуют обозначениям клонов на фиг. 3. "Промышленный стандарт" представлен моноклональным IgG2A мыши против ИЛ-11; клон № 22626;

кат. № MAB218; R&D Systems, Миннесота, США;

фиг. 8A и 8B - графики, отражающие активацию фибробластов в ответ на гипер-ИЛ-11. Клетки стимулировали указанным количеством (в нг/мл) гипер-ИЛ-11 или рекомбинантного ИЛ-11, и измеряли активацию фибробластов путем анализа процента α -SMA-положительных клеток. На (8A) и (8B) представлены результаты двух разных экспериментов;

фиг. 9 - график, отражающий индукцию секреции ИЛ-11 в первичных фибробластах под действием гипер-ИЛ-11. Клетки стимулировали гипер-ИЛ-11, и измеряли в супернатанте клеточной культуры уровни РНК ИЛ-11 и природного белка ИЛ-11 методом ИФА ELISA в заданные точки времени;

фиг. 10A-10F - графики, отражающие связывание антитела человека против ИЛ-11 и ИЛ-11 человека по оценке в ИФА ELISA. (10A) ИФА ELISA для клонов YU45-A3, YU45-A10, YU45-D11, YU45-E11, YU45-D12 и YU33-A2(IgG). (10B) ELISA для клонов YU45-G1, YU45-B2, YU45-A5, YU45-E3, YU45-F8 и YU33-H3(IgG). (10C) ELISA для клонов YU45-G8, YU45-F9, YU45-H10, YU45-F2, YU45-H3 и YU33-E3(IgG). (10D) ELISA для клонов YU45-A8, YU45-B5, YU45-D9, YU45-G7, YU45-B6 и YU45-F9. (10E) ELISA для клонов YU45-F5, YU46-B5, YU45-C1, YU46-A8, YU46-B6 и YU45-F9. (10F) ELISA для клонов YU46-E3, YU46-G8, YU46-D3, YU45-B6, YU45-C1 и YU45-F9;

фиг. 11 - таблица, обобщающая определенные значения EC_{50} для связывания антител человека против ИЛ-11 и ИЛ-11 по оценке в ИФА ELISA;

фиг. 12 - схематическое изображение процесса перестановки легких цепей антитела;

фиг. 13 - таблица, обобщающая данные для 16 клонов антитела мыши против ИЛ-11 человека;

фиг. 14 - гистограмма, отражающая ингибирование антителами мыши против ИЛ-11 передачи сигналов, опосредованной ИЛ-11 *in vitro* в фибробластах предсердий человека, исходя из кратности изменения процента α SMA-положительных клеток по сравнению с контрольными (нестимулированными) фибробластами после стимуляции ТФР- β 1 в присутствии антител мыши против ИЛ-11;

фиг. 15 - гистограмма, отражающая ингибирование антителами мыши против ИЛ-11 передачи сигналов, опосредованной ИЛ-11 *in vitro* в фибробластах предсердий мыши, исходя из кратности изменения процента α SMA-положительных клеток по сравнению с контрольными (нестимулированными) фибробластами после стимуляции ТФР- β 1 в присутствии антител мыши против ИЛ-11;

фиг. 16 - гистограмма, отражающая ингибирование антителами мыши против ИЛ-11 транс-передачи сигналов ИЛ-11, опосредованной гипер-ИЛ-11, *in vitro* в фибробластах предсердий человека, исходя из кратности изменения количества MMP2 в супернатанте клеточной культуры по сравнению с контрольными (нестимулированными) фибробластами после стимуляции гипер-ИЛ-11 в присутствии антител мыши против ИЛ-11;

фиг. 17 - таблица, обобщающая данные о кратности изменений, представленные на фиг. 14-16 для 16 антител мыши против ИЛ-11. Кандидатные антитела под номерами от 1 до 16 соответствуют обозначениям клонов согласно фиг. 13. Промышленный стандарт представлен моноклональным IgG2A-антителом мыши против ИЛ-11; клон #22626; кат.№ MAB218; R&D Systems, Миннесота, США;

фиг. 18A-18H. (A-B) таблица и гистограмма, отражающие связывание антител мыши против ИЛ-11 с ИЛ-11 человека по оценке в анализе iQue (18A) Таблица с обзорной информацией по результатам указанных экспериментов. (18B) Гистограмма, отражающая силу связывания относительно положительного контрольного антитела против FLAG (100%); номера соответствуют клонам, указанным на фиг. 17. (C-E) Антитела, которые нейтрализуют передачу сигналов ИЛ-11 в фибробластах (18C) человека и (18D) мыши, стимулированных ТФР- β 1, или (18E) в фибробластах человека стимулированных гипер-ИЛ-11 (ИЛ-11:ИЛ-11RA). (18F) Нейтрализация фиброзного ответа при применении 3С6 в фибробластах человека, стимулированных рекомбинантным ИЛ-11. (18G) Нейтрализация фиброзного ответа при применении 3С6 в фибробластах человека, стимулированных гипер-ИЛ-11 (ИЛ-11:ИЛ-11RA). (18H) Нейтрализация фиброзного ответа при применении 3С6 в клетках HSC человека стимулированных ТФР- β 1 (слева) или ИЛ-11 (справа);

фиг. 19 - таблица с обзорными данными по стратегиям пэннинга, используемым для идентификации антител человека против ИЛ-11 человека, способных связываться как с ИЛ-11 человека, так и с ИЛ-11 мыши после перестановки легких цепей;

фиг. 20 - диаграмма рассеяния, отражающая сигнал связывания с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши, определенный в ИФА ELISA, для антител человека против ИЛ-11 после перестановки легких цепей. Было идентифицировано 66 антител, демонстрирующих перекрестное связывание с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши (черные кружки). Антитела, связывающиеся только с ИЛ-11 мыши, обозначены серыми кружками;

фиг. 21A и 21B - гистограмма (21A) и таблица (21B), отражающие сигнал связывания с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши, определенного в ИФА ELISA, для 64 уникальных антител человека против ИЛ-11 после перестановки легких цепей;

фиг. 22 - гистограмма, отражающая значения EC_{50} в нг/мл для связывания указанных антител против ИЛ-11 после перестановки легких цепей с ИЛ-11 человека, определенные в ИФА ELISA;

фиг. 23A-23E - гистограмма, отражающая эффект антител против ИЛ-11 на секрецию MMP2 карди-

альными фибробластами предсердий человека в ответ на ТФР- β 1. На 23А и 23В представлены результаты двух отдельных экспериментов. Клетки культивировали в присутствии ТФР- β 1 (5 нг/мл) в течение 24 часов, в присутствии указанных антител против ИЛ-11 после перестановки легких цепей, или в присутствии изотипического контрольного IgG1 человека. Базальную секрецию MMP2 клетками в культуре измеряли путем культивирования в отсутствие ТФР- β 1, в присутствии изотипического контрольного IgG1 человека. Горизонтальными линиями обозначена базальная секреция MMP2 кардиальными фибробластами предсердий человека, культивированными в течение 24 ч в присутствии изотипического контрольного IgG1-антитела человека в отсутствие ТФР- β 1 (NEG); и секрецию MMP2 кардиальными фибробластами предсердий человека, культивированными в течение 24 ч в присутствии 5 нг/мл ТФР- β и изотипического контрольного IgG1-антитела человека (POS). На 23С показана нейтрализация фибринозного ответа *in vitro* по оценке результатов мониторинга уровней MMP2. Первичные фибробласты человека инкубировали с ТФР- β 1 (5 нг/мл) и кандидатными антителами формата IgG1 в варьирующих концентрациях. Оценивали секрецию MMP2 в супернатант фибробластами для расчета % ингибирования. На 23D показана нейтрализация фибринозного ответа *in vitro* для клонов YU100-G08 и YU100-H01. На 23Е показана нейтрализация транс-передачи сигналов ИЛ-11 для клонов YU100-G08 и YU100-H01;

фиг. 24 - таблица, обобщающая представленные на фиг. 22, 23А и 23В результаты определения функциональных характеристики указанных клонов антител против ИЛ-11 после перестановки легких цепей. Н/О = не определено;

фиг. 25А и 25В - изображения и график, отражающие результаты гистологического анализа срезов почек мышей, получавших разное лечение в модели фиброза легких на мышах. Фиброз почек индуцировали путем внутрибрюшинной (в/б) инъекции мышам фолиевой кислоты (FA, 180 мг/кг) в основе (0,3 М NaHCO₃); контрольным мышам вводили только основу. Мышам вводили изотипический контрольный IgG2 (20 мг/кг, 3 раза в неделю, внутрибрюшинно), антитело против ИЛ-11 (20 мг/кг, 3 раза в неделю, внутрибрюшинно) начиная с 1 дня после повреждения фолиевой кислотой и на протяжении всего эксперимента. Животных умерщвляли через 28 дней после индуцированного фолиевой кислотой повреждения почек и анализировали на фиброз гистологически с применением окрашивания трихромом по Массону. (25А) Изображения окрашенных трихромом по Массону срезы почек. Зоны фиброза, содержащие коллаген, выглядят более темными по сравнению со здоровыми зонами, которые выглядят более светлыми. (25В) Графики, отражающие полуколичественный анализ площади коллагена, выраженной как процент (%) от общей площади почек (график). ***, P<0,001 по сравнению с FA+IgG, ANOVA;

фиг. 26 - график, отражающий соотношение альбумина/креатинин в моче мышей, которые получали разное лечение в модели фиброза легких на мышах. Фиброз почек индуцировали путем внутрибрюшинной (в/б) инъекции мышам фолиевой кислоты (FA, 180 мг/кг) в основе (0,3 М NaHCO₃); контрольным мышам вводили только основу. Получавшим FA мышам вводили изотипический контрольный IgG2 (20 мг/кг, 3 раза в неделю, внутрибрюшинно) или антитело против ИЛ-11 (20 мг/кг, 3 раза в неделю, внутрибрюшинно) начиная с 1 дня после повреждения фолиевой кислотой и на протяжении всего эксперимента. Мышей помещали в метаболические клетки и измеряли креатинин и альбумин в моче с использованием коммерческих анализов (Abscam) в соответствии с инструкциями изготовителя. ***, P<0,001 по сравнению с FA+IgG, ANOVA;

фиг. 27А-27С - график, отражающий общий уровень коллагена в ткани почек у мышей, получавших разное лечение в модели фиброза почек на мышах. (27А) Фиброз почек индуцировали путем внутрибрюшинной (в/б) инъекции мышам фолиевой кислоты (FA, 180 мг/кг) в основе (0,3 М NaHCO₃); контрольным мышам вводили только основу. С 1 дня эксперимента мышам в группах лечения вводили изотипический контрольный IgG2 (20 мг/кг, 3× в неделю) или нейтрализующее антитело против ИЛ-11 в варьирующих дозах: 20 мг/кг × 3 раза в неделю; 10 мг/кг × 3 раза в неделю; 10 мг/кг × 2 раза в неделю; 5 мг/кг × 3 раза в неделю; 5 мг/кг × 2 раза в неделю; 1 мг/кг × 2 раза в неделю), внутрибрюшинно во всех случаях. Животных умерщвляли через 28 дней после инъекций и проводили анализ почек на фиброз (микрограммы/граммы (мкг/г)) с применением анализа на гидроксипролин, используя набор для анализа на общий коллаген Quickzyme Total Collagen Assay Kit (Quickzyme Biosciences) в соответствии с протоколом производителя. **, P<0,01; ***, P<0,001 по сравнению с FA+IgG, ANOVA. Дозозависимые эффекты антител против ИЛ-11 (27В) BSN-3C6 и (27С) YU100-G08_02А на содержание коллагена в почках при индуцированном фолиевой кислотой фиброзе почек;

фиг. 28А и 28В - изображения и график, отражающие результаты гистологического анализа срезов почек мышей, получавших разное лечение в модели острого повреждения почек на мышах. (28А) Мышам проводили либо ложную операцию, либо операцию с обструкцией одного мочеточника. Мыши получали IgG, антитело против ИЛ-11 (20 мг/кг на дни -1, 1, 3, 5 относительно операции), и собирали поврежденные почки (UUO IgG, ИЛ-11) или контралатеральные (Con) неповрежденные почки (Con IgG, ИЛ-11) на 7 день после операции. (28В) Полуколичественную оценку канальцевого повреждения проводили путем гистологического анализа цилиндров, канальцевой атрофии или расширения канальцев с маскированными экспериментальными условиями (Показатели оценки канальцевого повреждения: 0, отсутствует; 1, минимальное; 2, легкое; 3, умеренное; 4, тяжелое). *, P<0,05 по сравнению с UUO IgG,

ANOVA;

фиг. 29 - график, отражающий результаты ИФА ELISA/вестерн-блоттинга для ИЛ-11 на образцах печени человека. Образцы печени, полученные от пациентов, которым проводились хирургические операции на печени, использовали для анализа методом вестерн-блоттинга. Блоттинг ГАФДГ использовали в качестве нагрузочного контроля. В образцах из нормальной печени человека (НПЧ) содержатся низкие уровни белка ИЛ-11, тогда как в образцах от пациентов с фибротическими заболеваниями печени, в том числе алкогольной болезнью печени (АБП), первичным склерозирующим холангитом (ПСХ), первичным билиарным циррозом (ПБЦ) или неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) содержатся более высокие уровни ИЛ-11;

фиг. 30А-30С - ИЛ-11 и фиброз печени. (А) Гистограмма, отражающая результаты ИФА ELISA на секрецию ИЛ-11 в срезах печени СПОТ человека, подвергнутых различной обработке. (В) Трансдифференцировка звездчатых клеток печени человека в миофибробласты после стимуляции ИЛ-11 (24 ч) в присутствии 2 мкг/мл IgG или антитела против ИЛ-11 YU100-G08_02A. (С) YU100-G08_02A блокирует фиброзный ответ в клетках HSC, стимулированных эндогенным и экзогенным ИЛ-11;

фиг. 31А и 31В - изображения и график, отражающие результаты анализа ткани печени мышей, получавших разные варианты лечения в модели неалкогольного стеатогепатита на мышах. Мышей с диабетом (db/db; дефицитные по рецептору лептина) держали на протяжении 8 недель на обычном (слева, кружки) или на индуцирующем НАСГ (дефицит метионина/холина (MCD)) рационе. Подгруппе животных вводили нейтрализующее антитело против ИЛ-11 (20 мг/кг, 3 раза в неделю, внутривентриально) в течение последних 3 недель 8-недельного содержания на индуцирующем НАСГ рационе. Образцы печени фотографировали (31А) и оценивали содержание коллагена на мг ткани печени (31В); каждый символ соответствует индивидуальному животному. Р-значения показаны на графике, ANOVA;

фиг. 32А-32D - гистограмма и изображения, отражающие результаты анализа фиброза глаз у мышей, получавших разные варианты лечения в модели фиброза сетчатки на мышах. У мышей (10 на группу) индуцировали лазером повреждение сетчатки (по 4 ожога на сетчатку) и вводили интраокулярно 0,5 мкг антитела против ИЛ-11 или контрольного IgG-антитела на 1, 7, 14 и 21 день. На 28 день извлекали глаза для гистологического анализа. Площадь зон фиброза в участках ожога измеряли с применением окрашивания трихромом по Массону. (32А) Гистограмма, отражающая количественное определение площади зон фиброза у контрольных (IgG) или получавших лечение антителом против ИЛ-11 (ИЛ-11) мышей. (32В) Репрезентативные изображения, показывающие окрашивание фиброзных зон в глазах после лечения контрольным антителом (IgG, верхняя панель) или после лечения антителом против ИЛ-11 (ИЛ-11, нижняя панель). (32С) У мышей проводили лечение Eylea (Эйлеа) + контрольным IgG, или комбинированную терапию Eylea + BSN-3С6. Гистограмма, отражающая количественное определение площади зон фиброза при контрольном лечении, лечении антителом против ИЛ-11 в низкой концентрации или в высокой концентрации. (32D) Гистограмма, отражающая кратность изменения площади зон просачивания при хориоидальной неоваскуляризации до и после интравитреальных инъекций (И/В) при направленной против ИЛ-11 терапии (в низкой и высокой концентрации);

фиг. 33А-33С - схема, изображения и гистограмма, относящиеся к анализу фиброза кожи у мышей, получавших разные варианты лечения в модели фиброза кожи на мышах. (33А) Схематическое представление экспериментальных процедур для разных групп лечения. В группах 1 и 2 вводили блеомицин (BLM) и проводили лечение либо антителом против ИЛ-11 (группа 1) или контрольного IgG-антитела (группа 2). В группе 3 инъецировали только основу (ФСБ) и фиброз не развивался. (33В) Изображения окрашенных трихромом по Массону срезов кожи на равном расстоянии от сайта инъекции. Черной линией отмечена толщина кожи. (33С) Гистограмма, отражающая результаты анализа толщины кожи (маскированные группы лечения). Определяли среднюю толщину кожи от нижней части эпителиального слоя до верхней части слоя белой жировой ткани кожи на 40 полях зрения для каждого образца. Каждая точка соответствует одному животному. Р-значение вычисляли с использованием непарного двустороннего t-критерия;

фиг. 34 - изображения, отражающие результаты гистологического анализа фиброза сердца у мышей, которых подвергали разному лечению в модели фиброза сердца на мышах. У мышей (С57В16, самцы, возраст 8-12 недель) проводили индуцирующее фиброз поперечное сужение аорты (ТАС) или ложные операции. Животные после ТАС получали либо контрольное антитело (20 мг/кг, 3×/неделю, внутривентриально), либо нейтрализующее антитело против ИЛ-11 (20 мг/кг, 3×/неделю, внутривентриально). Через две недели сердца извлекали и оценивали степень фиброза с применением окрашивания трихромом по Массону;

фиг. 35А-35J - Сенсограммы и таблица, отражающие результаты одноциклового кинетического анализа аффинности связывания разных клонов антитела с ИЛ-11. На фиг. 35А-35I показано связывание YU100-G08 (35А), 02А (35В), 02G (35С), 02I (35D), 02L (35Е), 02Q (35F), 02S (35G), 02T (35H) и 02V (35I). На фиг. 35J обобщены данные кинетики, определенные для связывания разных клонов;

фиг. 36А-36J - сенсограммы и таблица, отражающие результаты одноциклового кинетического анализа аффинности связывания разных клонов антитела с ИЛ-11. На фиг. 36А-36I показано связывание

YU100-H01 (36A), 01A (36B), 01G (36C), 01I (36D), 01L (36E), 01Q (36F), 01S (36G), 01T (36H) и 01V (36I). На фиг. 36J обобщены данные кинетики, определенные для связывания разных клонов;

фиг. 37A-37I - графики, отражающие ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов разными клонами антитела, определенное путем анализа *in vitro* ингибирования продуцирования MMP2 кардиальными фибробластами предсердий человека после стимуляции ТФР- β 1. На фиг. 37A-37I представлены результаты, полученные для клонов YU100-H01 (37A), 01A (37B), 01G (37C), 01I (37D), 01L (37E), 01Q (37F), 01S (37G), 01T (37H) и 01V (37I);

фиг. 38A-38M - анализ ингибирования передачи сигналов ИЛ-11. (A-I) Графики, отражающие ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов разными клонами антитела, определенное путем анализа *in vitro* ингибирования продуцирования MMP2 кардиальными фибробластами предсердий человека после стимуляции ТФР- β 1. На фиг. 38A-38I представлены результаты, полученные для клонов YU100-G08 (38A), 02A (38B), 02G (38C), 02I (38D), 02L (38E), 02Q (38F), 02S (38G), 02T (38H) и 02V (38I). (J-M) Определение межвидовой перекрестной реактивности антитела против ИЛ-11 YU100-G08_02A (человека) и 3C6 (мыши) с применением фибробластов кожи макака: (J) % АСТА-положительные клетки, (K) секретируемый коллаген, (L) периостин, (M) концентрация коллагена;

фиг. 39A-39H - графики, отражающие эффект антитела против ИЛ-11 в модели НАСГ на мышах на (39A) содержание триглицеридов в печени, (39B) содержание гидроксипролина в печени, (39C, 39D) экспрессию провоспалительных факторов, (39E) уровни АЛТ в сыворотке; и (39F) уровни фосфорилированной ERK в печени. Все измерения сравнивали с контролем со стеатозом и IgG-контролем. Дозозависимые эффекты антител против ИЛ-11 (39G) BSN-3C6 и (39H) YU100-G08_02A на уровни АЛТ в сыворотке и содержание гидроксипролина в печени в модели НАСГ;

фиг. 40A-40D - терапевтический эффект антитела против ИЛ-11 в моделях на мышах НАСГ на поздней стадии. (A-C) Вестерн-блот и графики, отражающие эффект антитела против ИЛ-11 на активацию ERK (40A), содержание гидроксипролина в печени (40B) и уровни АЛТ в сыворотке (40C) в модели НАСГ на мышах после содержания на рационе с повышенным содержанием жира и дефицитом метионина/холина (HFMCDD) или обычном корме (NC). (40D) В другой модели НАСГ стимулировали единственной подкожной инъекцией стрептозотоцина; мышей держали на обычном корме в течение 4 недель, после чего переводили на HFMCDD-рацион на 7 недель, наряду с введением антитела против ИЛ-11 или контрольного IgG. График, отражающий экспрессию РНК генов фиброза и воспаления через 7 недель;

фиг. 41A-41D - репрезентативные флуоресцентные изображения и графики, отражающие эффект антитела против ИЛ-11 на трансформацию HSC в миофибробласты при стимуляции разными стимулирующими НАСГ факторами. Репрезентативные флуоресцентные изображения, отражающие (41A) количество АСТА2^{+ve} клеток и (41B) клеток, продуцирующих коллаген. Масштабная шкала: = 200 мкм. (41C) Процент АСТА2^{+ve} клеток после обработки. (41D) Продуцирование коллагена в клетках после обработки;

фиг. 42 - график, отражающий индуцированную ТФР- β 1 и CCL2 инвазию в матрикель клеток HSC, предварительно обработанных антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG;

фиг. 43 - график, отражающий эффект антитела против ИЛ-11 на секрецию CCL2 клетками HSC без стимула, стимулированными ИЛ-11 или стимулированными ТФР- β 1 в присутствии IgG или антитела против ИЛ-11;

фиг. 44A-44D - эффект обращения направленной против ИЛ-11 терапии на фиброз печени. (44A) Содержание гидроксипролина в печени, соответствующее общее содержание коллагена в печени (44B) Экспрессия Аста2 в клетках HSC. (44C) Процент АСТА2^{+ve} клеток HSC, стимулированных ТФР- β 1 или ТРФ. (44D) Концентрация MMP2 после стимуляции клеток HSC ТФР- β 1 или ТРФ;

фиг. 45A-45H - эффект направленной против ИЛ-11 терапии при НАСГ на ранней стадии. (45A) Репрезентативные макроскопические изображения печени. (45B) Вестерн-блоттинг, отражающий активацию ERK у мышей на HFMCDD-рационе после лечения антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG. (45C) Содержание триглицеридов у мышей на HFMCDD-рационе после лечения антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG. (45D) Репрезентативные изображения окрашенной трихромом по Массону печени мышей, получавших направленную против ИЛ-11 терапию или контрольный IgG. (45E) Уровни АЛТ в сыворотке у мышей на HFMCDD-рационе после лечения антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG. (45F) Тепловая карта Z-оценок дифференциальной экспрессии профибротических и провоспалительных генов у мышей на обычном корме и мышей на HFMCDD-рационе после лечения антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG. (45G) Экспрессия РНК провоспалительных генов. (45H) Экспрессия РНК профибротических генов;

фиг. 46A-46D - эффект ИЛ-11 на активацию, миграцию и инвазию фибробластов легких. (46A) Репрезентативное иммуноокрашивание ИЛ-11 и АСТА2 в серии срезов ткани легких от пациента с ИФЛ и здорового донора (контроль). Деление масштабной шкалы: 50 мкм. (46B) Общий секретируемый коллаген в супернатанте обработанных ИЛ-11 фибробластов. (46C) Индексы миграции в системе Transwell (46D) и инвазии в матрикель для фибробластов легких мыши дикого типа, индуцированные ИЛ-11. Деление масштабной шкалы: 150 мкм;

фиг. 47A и 47B - графики, отражающие кинетику связывания ИЛ-11 (47A) человека и (47B) мыши с

антителом против ИЛ-11 BSN-3С6. Показаны равновесные константы связывания;

фиг. 48А-48Е - эффект направленной против ИЛ-11 терапии на фиброз легких. (48А) Тепловые карты, отражающие количественное определение с использованием иммунофлуоресценции Аста^{2+ve} клеток и иммуноокрашивание Col1α1 (интенсивность/площадь) в фибробластах легких мыши, обработанных совокупностью профибротических стимулов в присутствии антитела против ИЛ-11 или контрольного IgG. (48В) Количественное определение АСТА^{2+ve} клеток, иммуноокрашивание COL1α1 (интенсивность/площадь) и секреция коллагена дифференцированными под действием ТФР-β1 фибробластами легких человека, обработанных антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG. (48С) Ингибирование MMP2 из стимулированных ТФР-β1 первичных фибробластов легких человека в присутствии антитела против ИЛ-11. (48D) Ингибирование Mmp2 из стимулированных ТФР-β1 первичных фибробластов легких мыши в присутствии антитела против ИЛ-11. (48Е) Эффект антитела против ИЛ-11 на миграцию и инвазию фибробластов легких мыши;

фиг. 49А-49Е - эффект ИЛ-11-терапии в модели индуцированного блеомицином (BLM) фиброза легких на ранних стадиях на мышцах. Мыши получали лечение антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG. (49А) Репрезентативное окрашивание срезов легких трихромом по Массону. Деление масштабной шкалы: 100 мкм. (49В) Графики, отражающие индексированную массу легких/массу тела и содержание гидроксипролина в легких. (49С) Денситометрический анализ вестерн-блотов для белков Col3a1, фибронектина и ИЛ-11 в гомогенатах легких. (49D) Экспрессия мРНК Col1a1, Col1a2, Col3a1, Fn1, Mmp2 и Timp1 в лизатах легких. (49Е) Вестерн-блоттинг для определения статуса фосфорилирования и общих уровней Erk и Stat3 в гомогенатах легких;

фиг. 50А-50D - эффект ИЛ-11-терапии в модели индуцированного блеомицином (BLM) сформированного фиброза легких на мышцах. (50А) Репрезентативное окрашивание срезов легких трихромом по Массону. Деление масштабной шкалы: 100 мкм. (50В) Графики, отражающие индексированную массу легких/массу тела и содержание гидроксипролина в легких. (50С) Вестерн-блоты для анализа уровней белка Col3a1, фибронектина и ИЛ-11 в гомогенатах легких. (50D) Вестерн-блоттинг для оценки статуса фосфорилирования и общих уровней Erk и Stat3 в гомогенатах легких;

фиг. 51А-51С - эффект терапии антителом против ИЛ-11 на рак. (51А) 3С6 предотвращает рост опухолей в модели опухолей НСС в боковой области тела у мышей. (51В) 3С6 предотвращает индуцированную ИЛ-11 спленомегалию в модели миелофиброза на мышцах с экспрессией ИЛ-11 в фибробластах. (51С) 3С6 обеспечивает аддитивный эффект в отношении ингибирования объема опухолей в сочетании с химиотерапией цисплатином в модели рака легкого (A549) на мышцах. ANOVA с апостериорной коррекцией Тьюки для множественного тестирования. Цисплатин + IgG; либо цисплатин + 3С6: **, P<0,01; ***, P<0,001. Размер групп: без лечения, n=5; Цисплатин + IgG, n=10; Цисплатин + 3С6, n=10;

фиг. 52 - роль ИЛ-11 в фиброзе поджелудочной железы. Мыши получали ежедневные инъекции 100 мкг/кг рекомбинантного ИЛ-11 мыши или солевого раствора на протяжении 21 дня. Содержание коллагена в поджелудочной железе оценивали с использованием калориметрического анализа содержания гидроксипролина;

фиг. 53А-53С - графики, отражающие эффекты лечения (53А) YU100-G08_02А или (53В) 3С6 на массу тела и потребление пищи в модели снижения массы тела, связанного с истощением. У мышей, получавших HFМCD-рацион, проводили лечение путем введения 2 раза в неделю 0,5, 1, 5 или 10 мг/кг антитела против ИЛ-11. Контрольным мышам либо давали обычный корм (NC), либо держали на HFМCD-рационе и проводили лечение контрольным изотипическим IgG. (53С) Эффект антитела против ИЛ-11 на массу тела мышей после повреждения почек, индуцированного фолатом;

фиг. 54А и 54В - способность гуманизированных клонов 3С6 VH 2.2/VL 2.1; VH 2.2/VL 2.2; VH 2.2/VL 2.3; VH 2.2/VL 2.4; VH 2.3/VL 2.2; и VH 2.3/VL 2.3 блокировать передачу сигналов ИЛ-11 и ингибировать продуцирование MMP2 (фиброгенного белка) в (А) первичных фибробластах предсердий человека и (В) HSC человека;

фиг. 55А-55С - способность YU100-G08_02А (IgG1) и YU100-G08_02А (IgG4) блокировать (55А) передачу сигналов эндогенного ИЛ-11, (55В) передачу сигналов экзогенного ИЛ-11 и (55С) транспердачу сигналов ИЛ-11 in vitro в клетках HSC человека. Для расчета % ингибирования оценивали секрецию MMP2 в супернатант фибробластами;

фиг. 56А и 56В - сравнение способности YU100-G08_02А (IgG1) и YU100-G08_02А (IgG4) обращать повреждение печени и фиброз в модели НАСГ in vivo. Через 4 недели на рационе и 3 недели лечения антителами оценивали уровни АЛТ в сыворотке (56А) и содержание коллагена в печени (анализ на НРА; 56В).

Примеры

В приведенных ниже примерах авторы настоящего изобретения описывают получение антител против ИЛ-11 и определение функциональных характеристик указанных антител.

Пример 1. Антитела человека против ИЛ-11

Полностью человеческие антитела человека против ИЛ-11 человека разрабатывали с применением фагового дисплея.

Рекомбинантный ИЛ-11 человека (Кат.№ Z03108-1) и рекомбинантный ИЛ-11 мыши (Кат.№ Z03052-1) получали от GenScript (Нью-Джерси, США). Рекомбинантный ИЛ-11 человека экспрессировали в клетках CHO, в виде Fc-меченого варианта и варианта без меток. ИЛ-11 мыши без меток экспрессировали в клетках HEK293.

Биологическую активность ИЛ-11 рекомбинантных ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши подтверждали в анализе *in vitro* на культурах первичных фибробластов.

Также получали рекомбинантные биотинилированные ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши путем биотинилирования молекул рекомбинантных ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши в соответствии со стандартными способами.

Антитела, способные связываться как с ИЛ-11 человека, так и с ИЛ-11 мыши (т.е. перекрестно-реактивные антитела) идентифицировали с помощью фагового дисплея, используя необученную библиотеку последовательностей человека путем пэннинга с биотинилированными и не биотинилированными рекомбинантными ИЛ-11 человека и мыши, на основе 16 разных стратегий пэннинга, обобщенных на фиг. 1.

При фаговом дисплее идентифицировано 175 связывающих scFv как "первые совпадения". В анализе последовательностей CDR из указанных 175 scFv идентифицировано 86 уникальных scFv.

Растворимые scFv получали путем рекомбинантной экспрессии в *E. coli* и анализировали на способность связываться с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши в ИФА ELISA. Вкратце, соответствующим антигеном покрывали лунки планшета для ELISA, добавляли супернатант культуры клеток, содержащий соответствующий scFv, в разведении 1:2, и детектировали связывание.

Результаты ИФА ELISA на связывание с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши представлены на фиг. 2.

В указанном анализе обнаружено

8 scFv, способных связываться только с ИЛ-11 человека;

6 scFv, способных связываться только с ИЛ-11 мыши;

32 scFv, демонстрирующих лишь слабое связывание ИЛ-11 человека/мыши, с высоким значением отношения шума к сигналу, и;

40 scFv, характеризующихся перекрестной реактивностью в отношении как ИЛ-11 человека, так и ИЛ-11 мыши.

Из указанных 86 scFv было выбрано 56 кандидатов для дальнейшего определения функциональных характеристик. Для дополнительного анализа указанные scFv клонировали в формате scFv-Fc в *E. coli*.

Обозначения клонов антител приведены на фиг. 3.

Последовательности VH и VL антител клонировали в экспрессионные векторы для получения антител scFv-Fc (IgG1 человека). Векторы транзientно экспрессировали в клетках млекопитающих, культивируемых в не содержащей сыворотки среде, и выделяли путем очищения с белком А.

Пример 2. Определение функциональных характеристик антител человека против ИЛ-11 человека

Антитела, описанные в примере 1, анализировали *in vitro* на предмет способности: (i) ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 человека, (ii) ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши, и (iii) ингибировать транс-передачу сигналов ИЛ-11 за счет ИЛ-11 в комплексе с ИЛ-11RA. Аффинность указанных антител в отношении ИЛ-11 человека также анализировали в ИФА ELISA.

2.1 Способность к ингибированию передачи сигналов, опосредованной ИЛ-11 человека

Для исследования возможности нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 человека, кардиальные фибробласты предсердий человека культивировали в лунках 96-луночных планшетов в присутствии ТФР-β1 (5 нг/мл) в течение 24 ч в присутствии или в отсутствие антител против ИЛ-11. ТФР-β1 способствует экспрессии ИЛ-11, которая, в свою очередь, запускает переход покоящихся фибробластов в активированные αSMA-положительные фибробласты. Ранее было показано, что нейтрализация ИЛ-11 предотвращает индуцируемый ТФР-β1 переход в активированные αSMA-положительные фибробласты.

Экспрессию αSMA анализировали в системе многопараметрической визуализации Operetta в автоматизированном режиме с высокой пропускной способностью.

В нестимулированных культурах в конце 24-часового периода культивирования ~29,7% (=1) фибробластов представляли собой αSMA-положительные активированные фибробласты, тогда как в культурах, которые стимулировали ТФР-β1 в отсутствие антител против ИЛ-11, αSMA-положительными были ~52% (= 1,81) фибробластов.

Антитела против ИЛ-11 (2 мкг/мл) добавляли в культуры фибробластов, которые стимулировали ТФР-β1, и в конце 24-часового периода культивирования определяли процент αSMA-положительных фибробластов. Проценты нормировали по проценту αSMA-положительных фибробластов, наблюдаемому в культурах фибробластов, не стимулированных ТФР-β1.

Результаты экспериментов представлены на фиг. 4А, 4В и 7. 28 антител продемонстрировали способность нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 человека.

Коммерческое моноклональное антитело мыши против ИЛ-11 (моноклональный IgG2A мыши; клон

№22626; Кат. № МАВ218; R&D Systems, Миннесота, США) также было проанализировано на способность ингибировать передачу сигналов ИЛ-11 человека в указанных экспериментах. Было обнаружено, что указанное антитело способно снижать процент активированных фибробластов до 28,3% (=0,99).

Несколько клонов нейтрализовали передачу сигналов ИЛ-11 человека в большей степени, чем коммерческое антитело мыши против ИЛ-11 (промышленный стандарт): YU45-C11/A10 (#6), YU45-G1 (#11), YU45-E3 (#16), YU45-F8 (#18), YU45-F9 (#21), YU45-H10 (#22), YU45-F2 (#24), YU45-H3 (#25), YU45-G7 (#33), YU45-B6 (#36), YU45-C1 (#42), YU46-B6 (#47), YU46-E3 (#50), YU46-G8 (#54) и YU46-D3 (#56).

2.2 Способность ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши

Также исследовали способность антител человека ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши, следуя процедуре согласно описанию в разделе 2.1 выше, однако с использованием фибробластов предсердий мыши вместо фибробластов предсердий человека.

Через 24 ч в культуре приблизительно 31,8% (=1) нестимулированных клеток в культуре представляли собой активированные фибробласты. Стимуляция ТФР- β 1 приводила к ~2-кратному увеличению процента активированных фибробластов (68,8% = 2,16) по сравнению с нестимулированными культурами.

Результаты указанных экспериментов представлены на фиг. 5А, 5В и 7. Продемонстрировано, что указанные антитела способны нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши. Также на способность ингибировать передачу сигналов ИЛ-11 мыши анализировали моноклональное IgG2А-антитело мыши против ИЛ-11, клон #22626, кат. № МАВ218. Указанное антитело, как было обнаружено, способно снижать процент активированных фибробластов до уровня 39,4% (=1,24).

Некоторые клоны нейтрализовали передачу сигналов ИЛ-11 в фибробластах предсердий мыши в большей степени, чем коммерческое антитело мыши против ИЛ-11 (промышленный стандарт): YU33-B4/YU45-G2/A3 (#3), YU45-H11/D12 (#9), YU45-G1 (#11), YU45-D2/H2/C7/F3/C9/E1/E9/C10/G3/H9/C5/A2/A5 (#14), YU45-B3 (#15), YU45-F8 (#18), YU45-H10 (#22), YU46-A10 (#23), YU45-A8/C6 (#27), YU45-D9/D3 (#31), YU45-B6 (#36), YU45-C1 (#42), YU46-A8 (#45), YU46-C1 (#48), YU46-H8 (#52), YU46-G8 (#54) и YU46-D3 (#56).

Также исследовали способность антитела человека ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши, с применением фибробластов кожи мыши.

Результаты указанных экспериментов представлены на фиг. 7. Продемонстрировано, что указанные антитела способны нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши.

Несколько клонов нейтрализовали передачу сигналов ИЛ-11 в фибробластах кожи мыши в большей степени, чем коммерческое антитело мыши против ИЛ-11 (промышленный стандарт): YU45-B6 (#36), YU45-C1 (#42) и YU46-H8 (#52).

2.3 Способность ИЛ-11 в комплексе с ИЛ-11R α ингибировать транс-передачу сигналов ИЛ-11

Транс-передача сигналов считается важным аспектом передачи сигналов ИЛ-6, когда комплекс ИЛ-6 и растворимого ИЛ-6R α может активировать клетки, которые экспрессируют gp130, однако не содержат рецептора ИЛ-6 (Hunter and Jones, 2015 Nature Immunology 16, 448-457).

Недавно было высказано предположение, что транс-передача сигналов комплекса ИЛ-11 и растворимого ИЛ-11R α также важна для биологии ИЛ-11 (Lokau et al., Cell Reports (2016) 14, 1761-1773). С применением рекомбинантного слитого белка ИЛ-11 и ИЛ-11R α (согласно описанию в Pflanz et al., Febs Lett (1999) 450:117-122) проводили скрининг антител против ИЛ-11 на способность ингибировать транс-передачу сигналов, опосредованную комплексом ИЛ-11:ИЛ-11R α .

Важно отметить, что антитела, которые способны ингибировать как классическую опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов, так и транс-передачу сигналов ИЛ-11 комплексом ИЛ-11:ИЛ-11R α , способны ингибировать все известные виды передачи сигналов ИЛ-11/ИЛ-11R.

Слитый белок ИЛ-11:ИЛ-11R α (здесь и далее называемый гипер-ИЛ-11) состоит из внеклеточного домена рецептора ИЛ-11-альфа (ИЛ-11R α), соединенного с ИЛ-11. Слитый белок ИЛ-11:ИЛ-11R α , который использовали в данном примере, имеет последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 4.

Было обнаружено, что гипер-ИЛ-11 является более мощным активатором фибробластов человека, чем рекомбинантный белок ИЛ-11. Вкратце, в двух отдельных экспериментах фибробласты человека культивировали без стимуляции ("Базовый уровень"), в присутствии разных количеств гипер-ИЛ-11 (0,008 нг/мл, 0,04 нг/мл, 0,2 нг/мл, 1 нг/мл и 5 нг/мл), или 5 нг/мл рекомбинантного ИЛ-11 человека, полученного из коммерческого источника, и анализировали активацию фибробластов путем определения процента α SMA-положительных клеток согласно описанию в настоящем документе. Результаты приведены на фиг. 8А и 8В. Гипер-ИЛ-11 активировал фибробласты дозозависимым образом и был более мощным активатором, чем ИЛ-11.

Слитый белок ИЛ-11:ИЛ-11R α получали следующим образом:

ДНК, кодирующую слитый белок ИЛ-11:ИЛ-11R α клонировали в рТТ5 вектор и трансфицировали клетки 293-6Е в культуре в не содержащей сыворотки среде для экспрессии Free Style™ 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific).

Клетки поддерживали в колбах Эрленмейера (Corning Inc.) при 37°C с 5% CO₂ на орбитальном шейкере (VWR Scientific).

Супернатанты клеточных культур, собранные на 6 день, использовали для очищения.

Супернатант клеточной культуры загружали на колонку для аффинного очищения.

После промывания и элюции подходящим буфером элюировавшие фракции объединяли и проводили замену буфера на конечный рецептурный буфер.

Очищенный слитый белок ИЛ-11:ИЛ-11R α анализировали с применением ДСН-ПААГ, вестерн-блоттинга для подтверждения молекулярной массы и чистоты.

Было показано, что фибробласты, культивированные *in vitro* и стимулированные гипер-ИЛ-11, повышающе регулируют экспрессию белка ИЛ-11 по оценке в ИФА ELISA (фиг. 9). Интересно, что увеличение уровней РНК ИЛ-11 не было детектировано в ответ на стимуляцию гипер-ИЛ-11. В отличие от ТФР- β 1, который увеличивает экспрессию ИЛ-11 на уровне как РНК, так и белка, гипер-ИЛ-11, по-видимому, повышающе регулирует экспрессию ИЛ-11 исключительно посттранскрипционным путем, на уровне белка.

Исследовали способность антител человека ингибировать передачу сигналов, опосредованную гипер-ИЛ-11.

Фибробласты предсердий человека, происходящие от 3 индивидуумов, инкубировали в течение 24 ч с гипер-ИЛ-11 (0,2 нг/мл) в присутствии нейтрализующего антитела против ИЛ-11 или изотипического контрольного антитела. После инкубации клетки окрашивали на α SMA для определения доли миофибробластов.

Через 24 ч в культуре приблизительно 26,5% (=1) нестимулированных клеток в культуре представляли собой активированные фибробласты. Стимуляция гипер-ИЛ-11 приводила к ~2-кратному увеличению процента активированных фибробластов (56,4% = 2,13) по сравнению с нестимулированными культурами.

Результаты экспериментов представлены на фиг. 6 и 7. Было продемонстрировано, что указанные антитела способны нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную гипер-ИЛ-11 (т.е. транспередачу сигналов ИЛ-11).

Моноклональное IgG2A-антитело мыши против ИЛ-11, клон № 22626, Кат. № MAB218, также было проанализировано на способность ингибировать передачу сигналов гипер-ИЛ-11. Было обнаружено, что указанное антитело способно снижать процент активированных фибробластов до 33,8% (=1,28).

Клон YU33-B4/YU45-G2/A3 (#3) нейтрализовал транс-передачу сигналов ИЛ-11 под действием гипер-ИЛ-11 в большей степени, чем коммерческое антитело мыши против ИЛ-11 (промышленный стандарт).

В результате проведения экспериментальных процедур, описанных выше, были идентифицированы клоны антител, которые обладают функциональными свойствами, значимыми для доклинической и клинической разработки антител, способных ингибировать передачу сигналов ИЛ-11/ИЛ-11-R.

Клоны YU33-B4/YU45-G2/A3 (#3), YU45-E3 (#16), YU45-F2 (#24), YU45-F5 (#39), YU46-A8 (#45) и YU46-G8 (#54) были идентифицированы как особенно перспективные кандидаты, демонстрирующие хорошую способность к ингибированию передачи сигналов как ИЛ-11 человека, так и ИЛ-11 мыши, и хорошее ингибирование транс-передачи сигналов ИЛ-11.

2.4 Анализ аффинности антител в отношении ИЛ-11 человека

Антитела человека против ИЛ-11 человека анализировали на аффинность связывания с ИЛ-11 человека с применением ИФА ELISA

Рекомбинантный ИЛ-11 человека получали из Genscript, а конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG человека (Fc-специфическое) - из Sigma. 96-луночные планшеты Corning для ИФА ELISA получали из Sigma. Набор Pierce с субстратом для ИФА ELISA 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМБ) получали из Life Technologies (0,4 г/мл раствор ТМБ, 0,02% пероксида водорода в буфере с лимонной кислотой). Бычий сывороточный альбумин и серную кислоту получали из Sigma. Промывочный буфер содержал 0,05% Tween-20 в забуференном фосфатом солевом растворе (ФСБ-Т). ScFv-Fc-антитела получали согласно описанию в примере 1. Очищенные контрольные IgG приобретали у Life Technologies. Для измерения поглощения использовали Tecan Infinite 200 PRO Nano-Quant.

Для определения оптимальной концентрации антигена для покрытия, первичных и вторичных антител выполняли перекрестный анализ с серийными разведениями согласно описанию в источнике: Hognbeck et al., (2015) *Curr Protoc Immunol* 110, 2.1.1-23).

Для оценки аффинности связывания первичных ScFv-Fc-антител при 50% эффективной концентрации (EC₅₀) проводили непрямой ИФА ELISA согласно приведенному ранее описанию (Unverdorben et al., (2016) *MAbs* 8, 120-128.). Планшеты для ИФА ELISA покрывали 1 мкг/мл рекомбинантного ИЛ-11R α человека в течение ночи при 4°C, а остальные сайты связывания блокировали 2% БСА в ФСБ. ScFv-Fc-антитела разводили в 1% БСА в ФСБ, титруют для получения рабочих концентраций 800, 200, 50, 12,5, 3,125, 0,78, 0,195 и 0,049 нг/мл и инкубируют в двух повторностях в течение 2 ч при комнатной темпера-

туре. Обнаружение связывания антигена с антителом осуществляли с 15,625 нг/мл HRP-конъюгированного антитела против IgG мыши. После 2 ч инкубации с антителом для обнаружения в течение 15 мин добавляли 100 мкл субстрата TMB и останавливали хромогенную реакцию 100 мкл 2 М H₂SO₄. Поглощение считывали при 450 нм с коррекцией при референсной длине волны 570 нм. Данные аппроксимировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism с логарифмическим преобразованием концентраций антитела с последующим нелинейным регрессионным анализом, используя асимметричную (пятипараметрическую) логистическую кривую доза-ответ для определения индивидуальных значений EC₅₀.

Те же материалы и процедуры, что и описанные выше, использовали для определения аффинности связывания моноклональных антител мыши против ИЛ-11, за исключением использования HRP-конъюгированного антитела против IgG мыши (H + L) вместо HRP-конъюгированного антитела против IgG человека.

Те же материалы и процедуры, что и описанные выше, использовали для определения аффинности связывания моноклональных антител человека против ИЛ-11 и моноклональных антител мыши против ИЛ-11 к рекомбинантному ИЛ-11 мыши, полученных от Genscript.

Результаты ИФА ELISA показаны на фиг. 10A-10F и их использовали для определения значений EC₅₀ для антител, которые приведены на фиг. 11.

2.5 Способность ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 человека, в разнообразных тканях

Способность антител нейтрализовать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов и транс-передачу сигналов в фибробластах, полученных из различных тканей исследуют по существу согласно описанию в разделах 2.1 и 2.3, за исключением того, что вместо кардиальных фибробластов предсердий человека для экспериментов используют фибробласты человека, происходящие из печени, легких, почек, глаза, кожи, поджелудочной железы, селезенки, кишечника, головного мозга и костного мозга.

Антитела против ИЛ-11 демонстрируют способность нейтрализовать передачу сигналов в фибробластах, происходящих из различных тканей, исходя из наблюдаемого относительного снижения доли αSMA-положительных фибробластов в конце 24-часового периода культивирования в присутствии антител против ИЛ-11 по сравнению с культивированием в отсутствие указанных антител.

Пример 3. Перестановка легких цепей в антителах человека против ИЛ-11 человека

Антитела к ИЛ-11 человека подвергают аффинному созреванию путем перестановки легких цепей с получением антител с улучшенной аффинностью в отношении ИЛ-11.

Перестановка цепей для улучшения аффинности антител представляет собой хорошо известную методику в области технологии антител, подробно описанную в источнике: Marks, *Antibody Affinity Maturation by Chain Shuffling, Antibody Engineering Methods and Protocols*, Humana Press (2004) Vol. 248, pp327-343, включенную в настоящий документ полностью посредством ссылки. В частности, перестановка легких цепей подробно описана в разделах 3.1 и 3.2 указанного руководства.

Вариабельные области тяжелых цепей антител человека против ИЛ-11 человека комбинируют с репертуаром партнеров - вариабельных областей легких цепей для идентификации новых комбинаций VL/VH с высокой аффинностью в отношении ИЛ-11.

Схематическое представление перестановки легких цепей приведено на фиг. 12. Вкратце, нуклеиновую кислоту, кодирующую домен VH антитела, клонируют в вектор для фагового дисплея, содержащий репертуар VL-цепей, и scFv, содержащие новые комбинации VH/VL, анализируют на связывание с человеком ИЛ-11 в ИФА ELISA.

Затем scFv с комбинациями VH/VL, демонстрирующими наиболее высокую аффинность связывания с ИЛ-11, анализируют на перекрестную реактивность с ИЛ-11 мыши.

Затем последовательности VH/VL из указанного scFv клонируют в экспрессионные векторы для получения антител scFv-Fc (IgG1 человека); указанные векторы транзientно экспрессируют в клетках млекопитающих, культивированных в среде без сыворотки, и выделяют методом очищения с белком А.

Пример 4. Моноклональные антитела мыши против ИЛ-11 человека

Также получали моноклональные антитела мыши, направленные против белка ИЛ-11 человека, следующим образом.

кДНК, кодирующую последовательность аминокислот ИЛ-11 человека, клонировали в экспрессионные плазмиды (Aldevron GmbH, Фрайбург, Германия).

Мышей иммунизировали путем внутрикожного введения покрытых ДНК частиц золота с применением ручного устройства для бомбардировки частицами ("генной пушки"). После нескольких иммунизаций собирали образцы сыворотки мышей и тестировали с применением проточной цитометрии на клетках НЕК, которые были транзientно трансфицированы экспрессионными плазмидами с ИЛ-11 человека (экспрессию ИЛ-11 человека на клеточной поверхности транзientно трансфицированными клетками НЕК подтверждали с помощью антител против метки, распознающих метку, добавленную к N-концу белка ИЛ-11).

Продуцирующие антитело клетки выделяли из организма мышей и сливали с клетками миеломы мыши (Ag8) в соответствии со стандартными процедурами.

Гибридомы, продуцирующие антитела, специфические в отношении ИЛ-11, идентифицировали путем скрининга на способность связываться с экспрессирующими ИЛ-11R α клетками НЕК с помощью проточной цитометрии.

С применением агента для защиты РНК (RNAlater, кат. № AM7020 от ThermoFisher Scientific) из положительных гибридных клеток получали клеточный осадок и дополнительно обрабатывали для секвенирования вариабельных доменов антител.

В общей сложности получали 16 клонов моноклональных антител мыши против ИЛ-11R человека (фиг. 13). Последовательности VH и VL, определенные для клона BSN-3C6, приведены в SEQ ID NO: 91-94. Последовательности VH и VL, определенные для клона BSN-1H2, приведены в SEQ ID NOs: 156 и 157. Последовательности VH и VL, определенные для клона BSN-7D4, приведены в SEQ ID NO: 174 и 175. Последовательности VH и VL, определенные для клона BSN-8H11, приведены в SEQ ID NO: 192 и 193.

Пример 5. Определение функциональных характеристик моноклональных антител мыши против ИЛ-11 человека

5.1 Способность к ингибированию передачи сигналов, опосредованной ИЛ-11 человека

Способность моноклональных антител мыши против ИЛ-11 человека ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 человека, исследовали с применением такого же анализа, как описанный в примере 2.1 выше.

Результаты экспериментов представлены на фиг. 14 и 17. Продемонстрировано, что указанные антитела способны нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 человека.

Также анализировали способность коммерческого моноклонального антитела мыши против ИЛ-11 (моноклональный IgG2A мыши; клон #22626; кат. № MAB218; R&D Systems, Миннесота, США) ингибировать передачу сигналов ИЛ-11 человека в указанных экспериментах. Было обнаружено, что указанное антитело способно снижать процент активированных фибробластов до 0,89-кратного уровня.

Было обнаружено, что клон A7 (BSN-3C11) нейтрализует передачу сигналов ИЛ-1 человека в большей степени, чем коммерческое антитело мыши против ИЛ-11 (промышленный стандарт).

5.2 Способность ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши

Также исследовали способность моноклональных антител мыши против ИЛ-11 человека ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши, в анализе согласно описанию в разделе 2.2 выше, однако с использованием фибробластов предсердий мыши вместо фибробластов кожи мыши.

Результаты экспериментов представлены на фиг. 15 и 17. Было продемонстрировано, что указанные антитела способны нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 мыши.

Коммерческое моноклональное антитело мыши против ИЛ-11 (моноклональный IgG2A мыши; клон № 22626; Кат. № MAB218; R&D Systems, Миннесота, США) также анализировали на способность ингибировать передачу сигналов ИЛ-11 человека в указанных экспериментах. Указанное антитело, как было обнаружено, способно снижать процент активированных фибробластов до 43,0% (=1,44).

Несколько клонов нейтрализовали передачу сигналов ИЛ-11 мыши в большей степени, чем коммерческое антитело мыши против ИЛ-11 (промышленный стандарт): A3 (BSN-2E1), A5 (BSN-2G6) и A6 (BSN-3C6).

5.3 Способность антител мыши против ИЛ-11 ингибировать транс-передачу сигналов ИЛ-11 за счет ИЛ-11 в комплексе с ИЛ-11RA

Исследовали способность антител мыши против ИЛ-11 ингибировать передачу сигналов, опосредованную гипер-ИЛ-11.

Фибробласты предсердий человека инкубировали в течение 24 ч с гипер-ИЛ-11 (0,2 нг/мл) в присутствии антител против ИЛ-11 (2 мкг/мл) или изотипического контрольного антитела, после инкубации супернатант культуры клеток анализировали на MMP2. Стимуляция гипер-ИЛ-11 приводит к увеличению секреции MMP2 по сравнению с нестимулированными культурами.

Результаты экспериментов представлены на фиг. 16 и 17. Было обнаружено, что антитела мыши против ИЛ-11 способны нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную гипер-ИЛ-11 (т.е. транс-передачу сигналов ИЛ-11), а несколько антител способны ингибировать транс-передачу сигналов в большей степени, чем коммерческое моноклональное антитело мыши против ИЛ-11 (моноклональный IgG2A мыши; клон #22626; кат. № MAB218; R&D Systems, Миннесота, США): BSN-2G6 (A5), BSN-3C6 (A6), BSN-5B8 (A9) и BSN-7D4 (A12).

В частности, клон BSN-3C6 (A6) был идентифицирован как многообещающий кандидат для дальнейшей разработки (выделен на фиг. 17), демонстрирующий хорошую способность ингибировать передачу сигналов, опосредованную как ИЛ-11 человека, так и ИЛ-11 мыши, и хорошее ингибирование транс-передачи сигналов ИЛ-11.

5.4 Скрининг антител мыши против ИЛ-1 на способность связывать ИЛ-11

Гибридомы мыши, продуцирующие антитела против ИЛ-11 человека, субклонировали, и супернатант клеточной культуры из субклонированных гибридом анализировали, используя метод "mix-and-measure" в анализе iQue, на (i) способность связываться с ИЛ-11 человека и (ii) перекрестную реактивность в отношении антигена, не являющегося ИЛ-11.

Вкратце, меченые контрольные клетки (не экспрессирующие ИЛ-11 на клеточной поверхности) и немеченые целевые клетки, экспрессирующие ИЛ-11 человека на поверхности (после транзientной трансфекции плазмидой, кодирующей FLAG-меченый ИЛ-11 человека) смешивали с супернатантом клеточной культуры (содержащим антитела мыши против ИЛ-11) и антителами для вторичного обнаружения (флуоресцентно меченое антитело против IgG мыши).

Затем клетки анализировали с применением системы скрининга HTFC Screening System (iQue) на указанные две метки (т.е. клеточная метка и метка на вторичном антителе). Обнаружение вторичного антитела на немеченых экспрессирующих ИЛ-11 клетках указывала на способность антител мыши против ИЛ-11 связываться с ИЛ-11. Обнаружение вторичного антитела на меченых контрольных клетках указывала на перекрестную реактивность антител мыши против ИЛ-11 в отношении мишени, не являющейся ИЛ-11.

В качестве положительных контрольных условий меченые и немеченые клетки инкубировали с антителом мыши против метки FLAG в качестве первичного антитела.

Результаты представлены на фиг. 18А и 18В. Большинство субклонированных гибридом экспрессировали антитело, способное связываться с ИЛ-11 человека и распознающее указанную мишень с высокой специфичностью.

Клоны BSN-2G6, BSN-5B8 и BSN-7F9 демонстрировали некоторую степень связывания с клетками, не экспрессирующими ИЛ-11, таким образом, они могут характеризоваться перекрестной реактивностью в отношении не являющейся ИЛ-11 мишени (мишеней). Антитело, продуцируемое субклоном BSN-3C11, как было обнаружено, не связывает ИЛ-11 человека.

13 из 16 антител демонстрировали более сильный сигнал связывания с ИЛ-11 по сравнению с сигналом положительного контрольного антитела против метки, указывая на связывание указанных антител с ИЛ-11 с высокой аффинностью.

Фибробласты человека стимулировали максимальной дозой ТФР- β 1 (5 нг/мл), самого сильного стимулятора экспрессии ИЛ-11 в фибробластах предсердий. Обычно это приводит к концентрации ИЛ-11 от ~500 пг/мл до 1 нг/мл в супернатанте через 24 ч; концентрация также зависит от генотипа первичных фибробластов предсердий. Преимущество указанного подхода заключается в том, что он обеспечивает ингибирование корректно уложенного эндогенно продуцируемого ИЛ-11 при физиологически релевантных максимальных уровнях продуцирования. В указанном анализе нейтрализуют соответствующую фиброзу аутокринную активность ИЛ-11 непосредственно на фибробластах. ТФР- β 1 стимулирует экспрессию ИЛ-11, которая затем запускает переход покоящихся фибробластов в активированные (ACTA2-положительные) фибробласты. Нейтрализующие антитела против ИЛ-11 должны ингибировать указанный переход. Соответственно, антитела, снижающие процент активированных фибробластов после стимуляции ТФР- β 1 в проведенном авторами изобретения скрининге *in vitro*, могут считаться нейтрализаторами и антифибротическими агентами.

На фиг. 18С представлены антитела, нейтрализующие передачу сигналов ИЛ-11. Активацию фибробластов человека отслеживали для идентификации нейтрализующих клонов. 100% ингибирование соответствует уровню миофибробластов (ACTA2+ve) в нестимулированных фибробластах, а 0% соответствует полностью активированным фибробластам и максимальному количеству миофибробластов.

Эксперимент повторяли на фибробластах мыши. Результаты представлены на фиг. 18D.

Указанные антитела также тестировали на способность ингибировать транс-передачу сигналов, используя активацию гипер-ИЛ-11 (ИЛ-11:ИЛ-11RA) фибробластов человека. Антитела, специфически связывающиеся ИЛ-11, инкубировали со стимулированными ИЛ-11:ИЛ-11RA первичными фибробластами. Для идентификации нейтрализующих клонов отслеживали активацию фибробластов человека. 100% ингибирование указывает на уровне нестимулированных фибробластов, а 0% - на полностью активированные фибробласты.

На фиг. 18Е представлены антитела, которые нейтрализуют транс-передачу сигналов ИЛ-11.

Значения IC50 определяли для клона 3С6 в первичных фибробластах предсердий человека, стимулированных рекомбинантным ИЛ-11 человека (2 нг/мл, 24 ч). Фиброзный ответ определяли путем измерения концентраций MMP2 и TIMP1 в супернатанте. Аналогичный эксперимент проводили с использованием 200 пг/мл гипер-ИЛ-11 в течение 24 ч для оценки блокады транс-передачи сигналов. Для расчета % ингибирования оценивали секрецию белка в супернатант фибробластами.

На фиг. 18F и 18G показана нейтрализация фиброзного ответа в обоих случаях.

Указанный эксперимент повторяли, используя звездчатые клетки печени человека (HSC), инкубированные с ТФР- β 1 (5 нг/мл) или ИЛ-11 (2 нг/мл), и определяя секрецию MMP2 в супернатант фибробластами для расчета % ингибирования. На фиг. 18H показана нейтрализация фиброзного ответа при применении 3С6 в клетках HSC, стимулированных ТФР- β 1 (слева) или ИЛ-11 (справа).

Пример 6. Химерные и гуманизированные варианты антител мыши против ИЛ-11 человека

Химерные варианты мыши/человека и гуманизированные варианты моноклональных антител мыши против ИЛ-11 человека из примера 4 получают в соответствии со стандартными способами.

6.1 Химерные антитела мыши/человека

Химерные антитела мыши/человека получают из моноклональных антител мыши против ИЛ-11 человека согласно описанию в источнике: Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, Michael Steinitz (Editor), Methods in Molecular Biology 1060, Springer Protocols, Humana Press (2014), глава 8.

Вкратце, определяют последовательности ДНК, кодирующие VH и VL, из гибридом, продуцирующих антитела мыши против ИЛ-11 человека, и комбинируют с последовательностью ДНК, кодирующей константные области иммуноглобулина человека для получения последовательности химерного антитела мыши/человека, с которой экспрессируют химерное антитело мыши/человека в клетках млекопитающих.

6.2 Гуманизированные антитела

Гуманизированные антитела получают из моноклональных антител мыши против ИЛ-11 человека согласно описанию в источнике: Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, Michael Steinitz (Editor), Methods in Molecular Biology 1060, Springer Protocols, Humana Press (2014), глава 7, в частности, раздел 3.1 главы 7, названный "Гуманизация антител".

Также были разработаны гуманизированные варианты последовательностей BSN-3С6; указанные варианты приведены в SEQ ID NO:116-128.

Вкратце, определяют последовательности ДНК, кодирующие VH и VL, из гибридом, продуцирующих антитела мыши против ИЛ-11 человека, и встраивают в последовательность ДНК, кодирующую каркасные области варибельной области антитела человека и константные области иммуноглобулина для получения последовательности гуманизированного антитела, с которого экспрессируют гуманизированное антитело в клетках млекопитающих.

Первичные фибробласты предсердий человека инкубировали с ТФР- β 1 (5 нг/мл) и гуманизированными клонами 3С6 в варьирующих концентрациях: VH 2.2/VL 2.1; VH 2.2/VL 2.2; VH 2.2/VL 2.3; VH 2.2/VL 2.4; VH 2.3/VL 2.2 и VH 2.3/VL 2.3.

Название	Тяжелая цепь	Легкая цепь
VH 2.2/VL 2.1	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:121
VH 2.2/VL 2.2	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:122
VH 2.2/VL 2.3	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:123
VH 2.2/VL 2.4	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:124
VH 2.3/VL 2.2	SEQ ID NO:118	SEQ ID NO:122
VH 2.3/VL 2.3	SEQ ID NO:118	SEQ ID NO:123

Первичные фибробласты предсердий человека инкубировали с ТФР- β 1 (5 нг/мл) и гуманизированными клонами 3С6 в варьирующих концентрациях. Для оценки % ингибирования оценивали секрецию MMP2 в супернатант фибробластами предсердий человека.

На фиг. 54А показано, что указанные антитела связываются с ИЛ-11 и блокируют взаимодействия эндогенно продуцированного ИЛ-11. Происходит нейтрализация передачи сигналов ИЛ-11, что ингибирует продуцирование фиброгенных белков.

Эксперимент повторяли с применением клеток HSC человека и клонов VH 2.2/VL 2.1, VH 2.2/VL 2.2, VH 2.2/VL 2.3 и VH 2.2/VL 2.4.

На фиг. 54В показано, что указанные антитела связываются с ИЛ-11 и блокируют взаимодействия эндогенно продуцированного ИЛ-11. Происходит нейтрализация передачи сигналов ИЛ-11, что ингибирует продуцирование фиброгенных белков.

Пример 7. Дополнительный биохимический анализ антител против ИЛ-11

Описанные в настоящем документе антитела подвергают дополнительному биохимическому анализу.

Указанные антитела анализируют с применением анализа BIAcore, биослойной интерферометрии (BLI) и микромасштабного термофореза (MST) для определения аффинности связывания с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши.

Определение аффинности антитела в анализе BIAcore методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) осуществляют согласно описанию в источнике: Rich et al., Anal Biochem. 2008 Feb 1; 373(1): 112-20.

Анализ аффинности антитела методом биослойной интерферометрии осуществляют согласно описанию в источнике: Conception et al., Comb Chem High Throughput Screen. 2009 Sep; 12(8):791-800.

Анализ аффинности антитела методом микромасштабного термофореза осуществляют согласно описанию в источнике: Jerabek-Willemsen et al., Assay Drug Dev Technol. 2011 Aug; 9(4): 342-353.

Агрегацию указанных антител анализируют методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) согласно описанию в источнике: Iacob et al., J Pharm Sci. 2013 Dec; 102(12): 4315-4329.

Гидрофобность указанных антител анализируют с применением хроматографии гидрофобного взаимодействия (НЦ) согласно описанию в Haverick et al., MAbs. 2014 Jul-Aug;6(4):852-8.

Температуру плавления антител анализируют с помощью дифференциальной сканирующей флуо-

риметрии (DSF) согласно описанию в источнике: Menzen and Friess, J Pharm Sci. 2013 Feb;102(2):415-28.

Пример 8. Ингибирование фиброза *in vivo* с применением антител против ИЛ-11

Терапевтическая полезность антител против ИЛ-11 человека продемонстрирована в моделях фиброза различных тканей на мышах *in vivo*. В экспериментах используют мышей дикого типа (т.е. ИЛ-11 RA+/+).

8.1 Фиброз сердца

Имплантируют помпу и вводят мышам AngII (2 мг/кг/сутки) в течение 28 дней.

Нейтрализующие антитела против ИЛ-11 или контрольные антитела вводят разным группам мышей путем внутривенной инъекции. В конце эксперимента оценивают содержание коллагена в предсердиях мышей с использованием набора для калориметрического анализа гидроксипролина, и анализируют уровень экспрессии РНК маркеров или фиброза Col1A2, α SMA (ACTA2) и фибронектина (Fn1) с помощью кПЦР.

Мыши, получавшие лечение нейтрализующими антителами против ИЛ-11, характеризуются пониженным фиброзным ответом в ткани сердца по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными антителами, о чем свидетельствует пониженная экспрессия маркеров фиброза.

8.2 Фиброз почек

Формировали модель фиброза почек на мышах, в которой фиброз индуцируют путем внутрибрюшинной инъекции фолиевой кислоты (180 мг/кг) в основе (0,3 М NaHCO₃); контрольным мышам вводили только основу.

Нейтрализующие антитела против ИЛ-11 или контрольные антитела вводят разным группам мышей путем внутривенной инъекции. Почки извлекают на 28 день, взвешивают и либо фиксируют в 10% нейтральном буферном растворе формалина для окрашивания трихромом по Массону и окрашивания красителем сириус, или мгновенно замораживают для анализа на коллаген, исследования РНК и белков.

Тотальную РНК экстрагируют из мгновенно замороженных почек с применением реагента Trizol (Invitrogen) в Qiagen TissueLyzer с последующим очищением на колонке RNeasy (Qiagen). кДНК получают с использованием набора для синтеза кДНК iScript™, где в каждой реакции содержалось по 1 мкг тотальной РНК, в соответствии с инструкциями производителя. Количественный РВ-ПЦР-анализ генной экспрессии осуществляют на образцах в трех повторностях, используя либо TaqMan (Applied Biosystems), либо технологию Fast SYBR Green (Qiagen) в системе StepOnePlus™ (Applied Biosystems) на протяжении 40 циклов. Данные экспрессии нормируют по уровню экспрессии мРНК ГАФДГ; для расчета кратности изменений используют метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Мгновенно замороженные почки подвергают кислотному гидролизу, нагревая в 6М HCl в концентрации 50 мг/мл (95°C, 20 ч). Общее количество коллагена в гидролизате количественно определяют на основании колориметрического обнаружения гидроксипролина с использованием набора для анализа на общий коллаген Quickzyme (Quickzyme Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя.

Мыши, получавшие лечение нейтрализующими антителами против ИЛ-11, характеризуются пониженным фиброзным ответом в ткани почек по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными антителами, о чем свидетельствует пониженная экспрессия маркеров фиброза.

8.3 Фиброз легких

Мышам внутритрахеально вводят блеомицин на 0 день для получения фиброзного ответа в легких (фиброз легких).

Нейтрализующие антитела против ИЛ-11 или контрольные антитела вводят разным группам мышей путем внутривенной инъекции. Мышей умерщвляют на 21 день и анализируют различия маркеров фиброза.

Мыши, получавшие лечение нейтрализующими антителами против ИЛ-11, характеризуются пониженным фиброзным ответом в ткани легких по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными антителами, о чем свидетельствует пониженная экспрессия маркеров фиброза.

8.4 Фиброз кожи

Мышам вводят блеомицин подкожно на 0 день для получения фиброзного ответа в коже.

Нейтрализующие антитела против ИЛ-11 или контрольные антитела вводят разным группам мышей путем внутривенной инъекции. Мышей умерщвляют на 21 день и анализируют различия маркеров фиброза.

Мыши, получавшие лечение нейтрализующими антителами против ИЛ-11, характеризуются пониженным фиброзным ответом в ткани кожи по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными антителами, о чем свидетельствует пониженная экспрессия маркеров фиброза.

8.5 Фиброз глаза

Для анализа фиброза в глазах мышам ИЛ-11RA -/- и мышам ИЛ-11RA +/+ проводили трабекулэктомию (фильтрационное хирургическое вмешательство) на 0 день, чтобы инициировать ранозаживляющий ответ в глазу. Указанная модель фильтрационного хирургического вмешательства при глаукоме на мышах, как было показано, эффективна для оценки ранозаживляющего ответа в глазу (Khaw et al. 2001, Curr Opin Ophthalmol 12, 143-148; Seet et al. 2011, Mol. Med. 17, 557-567) и с ее помощью успешно пока-

зан благоприятный эффект модуляторов фиброза *in vivo* (Mead et al. 2003, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44, 3394-3401; Wong et al. 2003 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44, 1097-1103; Wong et al. 2005, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46, 2018-2022).

Вкратце, конъюнктиву рассекают для обнажения подлежащей склеры, после чего в склере делают отверстие, выходящее в переднюю камеру глаза, с использованием иглы 30 калибра. Созданная фистула позволяет тканевой жидкости вытекать в конъюнктиву и под нее. Затем рассеченную конъюнктиву фиксируют и закрывают по краю склеральной шовной монофиламентной черной нейлоновой нитью Ethilon размера 10-0 (0,02 мм). В конце процедуры наносят мазь Фуциталмик. Хирургическое вмешательство осуществляют под анестезией, достигаемой путем внутрибрюшинного введения 0,1 мл смеси кетамина/ксилокаина, а также местного нанесения 1% ксилокаина по одной капле на глаз. Мазь Фуциталмик наносят после хирургического вмешательства для предотвращения инфекций. Хирургическое вмешательство проводят с применением простерилизованных 70% пропиловым спиртом хирургических ножниц и пинцета, и стерильных игл.

Под ушитой конъюнктивой скапливается жидкость в виде конъюнктивальной фильтрационной подушки. Мышей умерщвляют на 7 день после хирургического вмешательства для проведения анализов. Для проведения качественного иммуногистологического анализа извлекают глаза мышей посредством офтальмометомии и готовят срезы. Созревание волокон коллагена оценивают поляризационно-оптическим методом с красителем пикросириус красный (Szendroi et al. 1984, Acta Morphol Hung 32, 47-55); оранжево-красный цвет указывает на зрелый коллаген, а желтый/зеленый цвет указывает на недавно образованный незрелый коллаген.

Нейтрализующие антитела против ИЛ-11 или контрольные антитела вводят разным группам мышей путем внутривенной инъекции, и проводят мониторинг фиброза в ткани глаза.

Мыши, получавшие лечение нейтрализующими антителами против ИЛ-11, характеризуются пониженным фиброзным ответом в ткани глаза по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными антителами, о чем свидетельствует пониженная экспрессия маркеров фиброза.

8.6 Другие ткани

Также анализировали эффект лечения нейтрализующими антителами против ИЛ-11 на фиброз в моделях на мышах фиброза других тканей, таких как печень, почки, кишечник, а также в модели, соответствующей мультиорганному (т.е. системному) фиброзу.

Фиброзный ответ измеряют и сравнивают у мышей, получавших лечение нейтрализующими антителами против ИЛ-11, и мышей, получавших лечение контрольными антителами. Мыши, получавшие лечение нейтрализующими антителами против ИЛ-11, характеризуются пониженным фиброзным ответом по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными антителами, о чем свидетельствует пониженная экспрессия маркеров фиброза.

Пример 9. Лечение рака *in vivo* с применением антител против ИЛ-11

Эффект лечения нейтрализующими антителами против ИЛ-11 на рак анализируют в моделях рака на мышах.

Модели рака молочной железы, легкого, желудочно-кишечного тракта формируют у мышей, которые получают лечение путем введения нейтрализующих антител против ИЛ-11 или контрольных антител, и проводят мониторинг развития/прогрессирования рака.

Наблюдается противораковый эффект нейтрализующих антител против ИЛ-11, на что указывает уменьшение симптомов рака и/или увеличение продолжительности выживания по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольными антителами.

Оценивали эффект антител против ИЛ-11 на рост опухолей. Исследовали несколько различных моделей рака.

Клетки рака печени (НСС) имплантировали мышам (модель с имплантацией в боковую область) и отслеживали объем опухолей в течение 3 недель после имплантации. Мышей лечили антителами 3С6 или контрольными IgG-антителами. Отслеживали размер опухолей.

На фиг. 51А показано, что размер опухолей, как было обнаружено, значительно снижается при лечении только антителом против ИЛ-11, что указывает на терапевтический эффект ингибирования передачи сигналов ИЛ-11 при раке печени.

Создавали модель на мышах, демонстрирующих избыточную экспрессию ИЛ-11 в фибробластах, с развитием тяжелого глобального фиброза органов, обусловленного секрецией ИЛ-11 из фибробластов. Селезенка увеличивается в размере в 2 раза в течение 3 недель и демонстрирует глубокие и легко измеряемые изменения, связанные с ИЛ-11, вероятно, вызванные миелофиброзом (тип рака костного мозга). Антитело 3С6 предотвращает индуцированную ИЛ-11 спленомегалию у трансгенных мышей, фибробласты которых экспрессируют ИЛ-11, в модели миелофиброза, как показано на фиг. 51В.

Эффект антитела против ИЛ-11 3С6 оценивали в модели рака легких в сочетании с химиотерапией цисплатином.

Мышам подкожно инокулировали опухолевые клетки A549 (5×10^6 ; 0 день). Мышей либо не лечили, либо лечили цисплатином (6 мг/кг, дважды в неделю) с добавлением либо IgG-антител (10 мг/кг \times 2 раза

в неделю, в/б) или 3С6 (10 мг/кг × 2 раза в неделю, в/б) в течение 5 недель. Объемы опухолей измеряли дважды в неделю.

Результаты представлены на фиг. 51С. Терапия антителами против ИЛ-11 обеспечивает аддитивный эффект в отношении ингибирования объема опухолей при введении в комбинации с химиотерапией цисплатином.

Пример 10. Лечение AMD с применением антител против ИЛ-11

Исследовали эффект лечения нейтрализующими антителами против ИЛ-11 при влажной форме возрастной макулярной дегенерации (AMD).

Нейтрализующее антитело против ИЛ-11 вводят субъектам с влажной формой AMD. Согласно некоторым вариантам условий лечения субъекты получают терапию антагонистами ФРЭС (например, ранибизумабом, бевацизумабом, пегаптанибом, бролуцизумабом или афлиберцептом), терапию антагонистами ТРФ (например, пегплеранибом) или лазерную коагуляционную терапию наряду с лечением антителом против ИЛ-11.

У субъектов, которые получали лечение антителом против ИЛ-11, наблюдается снижение патологии при влажной форме AMD и/или улучшение симптомов при влажной форме AMD относительно субъектов, которые не получали лечения антителом против ИЛ-11.

Пример 11. Антитела после перестановки легких цепей

Перестановку легких цепей выполняли согласно схеме, представленной на фиг. 12.

Для перестановки легких цепей использовали тяжелые цепи следующих связывающих ИЛ-11 клонов антител: YU45-E03, YU45-F02, YU45-F05, YU45-G02, YU46-A08, YU46-G08.

Вариабельные области тяжелых цепей амплифицировали с помощью ПЦР, полученные ампликоны объединяли и клонировали в фагмидные векторы (фагмиды), каждый из которых содержал специфическую VL-цепь, представляющие репертуары необученной библиотеки легких цепей лямбда и каппа. Содержащие VH и VL фагмиды использовали для получения новой библиотеки фагов с антителами, которую использовали для отбора клонов, демонстрирующих связывание с ИЛ-11 в жестких условиях (т.е. ограничение уровня антигена, значительное число этапов промывания).

Антитела, способные связываться как с ИЛ-11 человека, так и с ИЛ-11 мыши (т.е. перекрестно-реактивные антитела) идентифицировали с помощью фагового дисплея, путем пэннинга с использованием биотинилированных и небитинилированных рекомбинантных ИЛ-11 человека и мыши на основе стратегий пэннинга, показанных на фиг. 19.

В указанном анализе было идентифицировано 66 перекрестно-реактивных антител (фиг. 20). При анализе последовательностей идентифицировано 64 уникальных клонов антител.

Анализировали сигнал связывания указанных 64 клонов антител с ИЛ-11 человека и ИЛ-11 мыши в ИФА ELISA. Результаты представлены на фиг. 21А и 21В.

Пример 12. Определение функциональных характеристик антител после перестановки легких цепей
54 антитела после перестановки легких цепей анализировали на способность связывать ИЛ-11 и ингибировать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов.

12.1 Связывание с ИЛ-11 человека

Антитела против ИЛ-11 после перестановки легких цепей анализировали для определения ЕС50 для связывания с ИЛ-11 человека в ИФА ELISA в соответствии со стандартными способами. Вкратце, лунки микротитрационных планшетов покрывали рекомбинантным ИЛ-11 человека (100 нг/лунку), добавляли серийные разведения scFv-Fc, содержащих домены VH и VL указанных клонов, и связывание антител детектировали с использованием системы обнаружения поликлональных антител.

Результаты анализов ИФА ELISA использовали для вычисления значений ЕС50 (нг/мл) для клонов антител после перестановки легких цепей; указанные значения приведены на фиг. 22.

12.2 Способность ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 человека

Для исследования способности клонов антител после перестановки легких цепей нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11 человека, кардиальные фибробласты предсердий человека культивировали в лунках 96-луночных планшетов в присутствии ТФР-β1 (5 нг/мл) в течение 24 ч, в присутствии антител против ИЛ-11 в формате scFv-IgG1 человека-Fc, или в присутствии изотипического контрольного IgG1-антитела человека в конечной концентрации 2 мг/мл. Затем измеряли уровни про-фибротического маркера MMP2 в супернатанте клеточной культуры в ИФА ELISA. Базальную секрецию MMP2 клетками в культуре измеряли путем культивирования в отсутствие ТФР-β1, в присутствии изотипического контрольного IgG1 человека (2 мг/мл).

Результаты двух отдельных экспериментов приведены на фиг. 23А и 23В. Горизонтальными линиями на гистограммах обозначена базальная секреция MMP2 кардиальными фибробластами предсердий человека, культивированными в течение 24 ч в присутствии изотипического контрольного антитела IgG1 человека в отсутствие стимуляции ТФР-β1 ("NEG" на фиг. 23А и 23В), и секреция MMP2 кардиальными фибробластами предсердий человека, культивированными в течение 24 ч в присутствии 5 нг/мл ТФР-β1 изотипического контрольного антитела IgG1 человека ("POS" на фиг. 23А и 23В).

Было показано, что антитела против ИЛ-11 после перестановки легких цепей способны связываться

с ИЛ-11 человека и ингибировать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов. Результаты обобщены на фиг. 24.

Девять клонов дополнительно анализировали на основании их характеристик и проводили скрининг на нейтрализацию эндогенного ИЛ-11, как описано выше. Для расчета % ингибирования оценивали секрецию MMP2 в супернатант фибробластами.

На фиг. 23С показано, что некоторые антитела связываются с эндогенно продуцируемым ИЛ-11, нейтрализуют передачу сигналов ИЛ-11 в фибробластах и ингибируют продуцирование фиброгенного белка.

Для более точного расчета значений IC50 для клонов YU100-G08 и YU100-H01 описанный выше эксперимент повторяли с использованием более низких концентраций антител (диапазон: 0,061, 0,244, 0,976, 3,9, 15,625, 62,5, 250, 1000 и 4000 нг/мл) и первичных фибробластов предсердий. Для оценки % ингибирования оценивали секрецию MMP2 в супернатант фибробластами.

На фиг. 23Е показано, что оба антитела связываются с эндогенно продуцируемым ИЛ-11, нейтрализуют передачу сигналов ИЛ-11 в фибробластах и ингибируют продуцирование фиброгенного белка. Стимуляция фибробластов человека рекомбинантным ИЛ-11 (2 нг/мл, 24 ч) также показала, что оба антитела нейтрализуют передачу сигналов ИЛ-11 в фибробластах и ингибируют продуцирование фиброгенного белка.

Оценивали способность YU100-G08 и YU100-H01 ингибировать транс-передачу сигналов ИЛ-11. Первичные фибробласты человека стимулировали ИЛ-11:ИЛ-11RA (гипер-ИЛ-11; 0,2 нг/мл, 24 ч). Для оценки % ингибирования оценивали секрецию MMP2 в супернатант фибробластами.

На фиг. 23Е показано, что оба антитела нейтрализуют транс-передачу сигналов ИЛ-11 и ингибируют продуцирование фиброгенного белка.

Пример 13. Ингибирование фиброза почек или повреждения почек с применением антител против ИЛ-11

У однопометных мышей возрастом 10-12 недель с аналогичной массой тела был индуцирован фиброз почек путем внутрибрюшинной (в/б) инъекцией фолиевой кислоты (180 мг кг⁻¹) в основе (0,3 М NaHCO₃); контрольным мышам вводили только основу.

Клон антитела против ИЛ-11 BSN-3С6 вводили через день после введения фолиевой кислоты, а затем 3 раза в неделю в дозе 20 мг/кг. Мышей умерщвляли через 28 дней после инъекции.

Уровни мочевины и креатинина в плазме мышей количественно определяли с использованием набора для анализа на мочевины (ab83362, Abcam) и набора для анализа на креатинин (ab65340, Abcam), соответственно, в соответствии с инструкциями изготовителя. Общее количество коллагена в почках количественно определяли на основании колориметрического обнаружения гидроксипролина с использованием набора для анализа на общий коллаген Quickzyme (Quickzyme Biosciences). Все колориметрические анализы выполняли в соответствии с инструкциями производителя.

Ткани заливали в парафин и готовили срезы почек толщиной 3 мкм. Для получения парафиновых срезов ткани фиксировали в течение 24 ч при комнатной температуре в 10% нейтральном буферном растворе формалина (Sigma-Aldrich), обезвоживали и заливали в парафин. Для получения криосрезов свежезвлеченные органы заливали составом для оптимальной температуры срезов Tissue-Tek (VWR International). Затем криоформы замораживали в металлическом стакане с изопентаном, охлажденном жидким азотом, и срезы хранили при -80°C. Общий коллаген окрашивали, используя набор для окрашивания трихромом по Массону (HT15, Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя. Захватывали изображения срезов и окрашенные голубым зоны фиброза полуколичественно определяли с помощью программного обеспечения ImageJ (версия 1.49). Для проведения иммуногистохимического исследования срезы ткани инкубировали с антителом против АСТА2 (ab5694, Abcam). Окрашивание первичного антитела визуализировали с использованием набора для обнаружения ImmPRESS (HRP Anti-Rabbit IgG Polymer Detection kit, Vector Laboratories) с субстратом пероксидазы ImmPACT (DAB Peroxidase Substrate, Vector Laboratories) в качестве хромогена. Затем срезы контрокрашивали гематоксилином Майера (Merck).

На фиг. 25А и 25В видно, что в тканях мышей, получавших лечение антителом против ИЛ-11, как было обнаружено, значительно снижен уровень окрашивания на коллаген, что указывает на ингибирование фиброза почек при лечении антителом против ИЛ-11.

На фиг. 26 видно, что соотношение альбумин/креатин в моче значительно снижалось при лечении антителом против ИЛ-11, что указывает на пониженный уровень повреждения почек у мышей, получавших лечение антителом против ИЛ-11.

На фиг. 27А показано, что лечение антителом против ИЛ-11 ингибировало индуцированный фолиевой кислотой фиброз почек дозозависимым образом.

Оценивали способность антител против ИЛ-11 BSN-3С6 и YU100-G08 02А снижать индуцированный фолиевой кислотой фиброз почек в разных концентрациях (0,5, 1, 5 и 10 мг/кг). IgG (10 мг/кг) использовали в качестве контроля. Инъекции антител начинали проводить за день до введения фолата и повторяли один раз в две недели. Животных умерщвляли через три недели после индуцированного фолатом повреждения для оценки содержания коллагена в почках с применением НРА-анализа. На фиг. 27В и

27С показано, что терапия антителом против ИЛ-11, как было обнаружено, снижает содержание коллагена в почках при индуцированном фолиевой кислотой фиброзе почек дозозависимым образом.

В другом эксперименте в модели на мышах индуцировали острое повреждение почек в результате односторонней обструкции мочеточника (UUO). Вкратце, мышам проводили ложную операцию или осуществляли обструкцию одного мочеточника. Мыши получали IgG, клон антитела против ИЛ-11 BSN-3С6 (20 мг/кг; на -1, 1, 3, 5 дни относительно операции) и поврежденные почки ("UUO") или контралатеральные неповрежденные почки (Con) собирали на день 7 после операции.

Полуколичественную оценку канальцевого повреждения проводили путем гистологического анализа цилиндров, канальцевой атрофии или расширения канальцев с маскированными экспериментальными условиями (Показатели оценки канальцевого повреждения: 0, отсутствует; 1, минимальное; 2, легкое; 3, умеренное; 4, тяжелое).

На фиг. 28А и 28В показано, что лечение антителом против ИЛ-11 снижало канальцевое повреждение в модели острого повреждения почек на мышах.

Пример 14. ИЛ-11 и фиброз печени

Экспрессию белка ИЛ-11 в здоровой и пораженной заболеванием печени подтверждали методом вестерн-блоттинга на соответствующих образцах печени человека. Соответствующие замороженные образцы печени готовили для вестерн-блоттинга и определяли уровни ИЛ-11, используя моноклональное IgG2А-антитело мыши против ИЛ-11 человека, клон #22626, кат. № МАВ218, от R&D Systems. Получали изображения на пленке.

Результаты представлены на фиг. 29. Повышенная экспрессия ИЛ-11 относительно нормальной здоровой печени была детектирована в большинстве пораженных заболеванием тканей.

Для определения того, изменялась ли экспрессия ИЛ-11 при заболевании, проводили ИФА ELISA на срезах от срезов печени определенной толщины (СПОТ), используя набор для 15 планшетов для анализа ИЛ-11 человека DuoSet, кат. № DY218 от R&D Systems.

Готовили срезы печени (СПОТ) человека и инкубировали при обработке разными средами после 24-часового периода выдерживания для акклиматизации к планшетам со средой. Образцы обрабатывали только средой (контроль), средой с ЛПС, комбинацией профиброгенных стимулов, в том числе ТФР-β1, или комбинацией профиброгенных стимулов, в том числе ТФР-β1, и ингибитором ТФР-β1 - ALK5.

Результаты представлены на фиг. 30А. Профиброгенные стимулы индуцировали стимулирующую регуляцию экспрессии белка ИЛ-11, а ингибитор ALK5, как было обнаружено, ингибирует передачу сигналов через рецепторы ТФР-β1, что снижало экспрессию белка ИЛ-11 до контрольных уровней.

Звездчатые клетки печени (HSC) представляют собой предшественники миофибробластов в печени. Оценивали способность BSN-3С6 и YU100-G08_02А блокировать переход HSC в миофибробласты, на что указывает снижение содержания АСТА2⁺vc клеток при инкубировании HSC с ТФР-β1 (24 ч) и нейтрализующими антителами (2 мкг/мл).

На фиг. 30В показано, что оба антитела против ИЛ-11 ингибировали транс-дифференцировку HSC в миофибробласты после стимуляции ИЛ-11 под действием ТФР-β1.

IC50 для YU100-G08_02А определяли путем измерения концентрации MMP2 в клетках HSC, стимулированных ИЛ-11. Первичные HSC человека инкубировали с ТФР-β1 (5 нг/мл) (слева) или ИЛ-11 (2 нг/мл) (справа) и антителом в варьирующих концентрациях. Для расчета % ингибирования оценивали секрецию MMP2 в супернатант фибробластами.

На фиг. 30С показано, что YU100-G08_02А нейтрализует фиброзный ответ в клетках HSC.

14.1 Ингибирование фиброза печени с применением антител против ИЛ-11 в доклинической модели НАСГ

Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) представляет собой распространенное заболевание печени, характеризующиеся прогрессирующим от воспаления к фиброзу и результирующей печеночной недостаточностью.

Мышей с диабетом (db/db; дефицитные по рецептору лептина) держали на протяжении 8 недель на обычном корме или на индуцирующем НАСГ (дефицит метионина/холина (MCD)) рационе. Для тестирования эффективности нейтрализующих антител против ИЛ-11 вводили клон антитела против ИЛ-11 BSN-3С6 (20 мг/кг, 3× раза в неделю, внутривенно) в течение последних 3 недель 8-недельного содержания на индуцирующем НАСГ рационе (фиг. 31А, нижние панели). Макроскопическую гистологию печени оценивали в момент умерщвления, и анализировали содержание коллагена в печени в анализе на гидроксипролин.

Результаты представлены на фиг. 31А и 31В. Ингибирование опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов при лечении антителом против ИЛ-11 улучшало гистологические показатели печени в модели неалкогольного стеатогепатита на мышах (фиг. 31А), о чем свидетельствует частичное восстановление морфологии и текстуры печени у получавших лечение антителом против ИЛ-11 животных на индуцирующем НАСГ рационе по сравнению с не получавшими лечения животными на индуцирующем НАСГ рационе. Также обнаружено, что в печени мышей, получавших лечение антителом против ИЛ-11 на индуцирующем НАСГ рационе, снижено содержание коллагена по сравнению с не получавшими лечения

животными на индуцирующем НАСГ рационе (фиг. 31В).

В той же модели НАСГ на мышах с диабетом животным давали обычный корм (NC) в течение 12 недель до достижения стадии стеатоза. Затем мышей переводили на MCD-рацион на 8 недель, чтобы индуцировать НАСГ. В течение указанных 8 недель мышам вводили 20 мг/кг антитела против ИЛ-11 BSN-3С6 или контрольного IgG два раза в неделю.

Измерения уровня триглицеридов (TG) в печени проводили с использованием набора для колориметрического анализа на триглицериды (10010303, Cayman). Общее содержание гидроксипролина в печени измеряли, используя набор для анализа на общий коллаген Quickzyme (Quickzyme Biosciences). Уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке мышей измеряли, используя набор для анализа активности аланинтрансаминазы (ab105134, abcam). Для количественного определения экспрессии провоспалительных факторов тотальную РНК экстрагировали из мгновенно замороженных тканей печени с использованием тризола (Trizol, Invitrogen) с последующим очищением на колонке RNeasy (Qiagen). кДНК синтезировали с использованием набора для синтеза кДНК iScript™ (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями изготовителя. Анализ геной экспрессии выполняли на образцах в двух повторностях, используя либо TaqMan (Applied Biosystems), либо метод Fast SYBR Green (Qiagen) в системе StepOne-Plus™ (Applied Biosystem) на протяжении 40 циклов. Данные экспрессии нормировали по экспрессии мРНК ГАФДГ и рассчитывали кратность изменения (КИ) методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Уровни общей и фосфорилированной ERK в печени измеряли с использованием вестерн-блоттинга. Все измерения сравнивали с контрольным стеатозом.

Результаты представлены на фиг. 39А-39F. Терапия антителом против ИЛ-11 3С6, как было обнаружено, снижает содержание триглицеридов в печени (39А), содержание гидроксипролина в печени (39В), экспрессию провоспалительных факторов (39С, 39D), уровни АЛТ в сыворотке (39Е) и уровни фосфорилированной ERK в печени (39F).

Таким образом, направленная против ИЛ-11 терапия, как было обнаружено, снижает стеатоз, фиброз и воспаление печени на поздних стадиях НАСГ по сравнению с контролями.

Эффекты разных концентраций антител против ИЛ-11 BSN-3С6 и YU100-G08_02А (0,5, 1, 5 и 10 мг/кг) оценивали в модели НАСГ через 4 недели на НАСГ-рационе (HFМCD) для индуцирования повреждения печени и фиброза. После одной недели на НАСГ-рационе (к этому времени формируется стабильный стеатогепатит и уровни АЛТ составляют ~800 мкг/л (~40-кратное увеличение по сравнению с обычным кормом)) животным начинали вводить контрольные IgG-антитела или ENx108А каждые две недели в течение четырехнедельного периода. В качестве контрольных использовали мышей, получавших обычный корм и IgG (10 мг/кг). Уровни АЛТ в сыворотке и содержание коллагена в печени измеряли согласно описанию выше.

Результаты представлены на фиг. 39G и 39H. Направленная против ИЛ-11 терапия, как было обнаружено, оказывает дозозависимый смягчающий эффект на индикаторы фиброза - уровни АЛТ в сыворотке и содержание коллагена в печени.

В отдельном эксперименте самцов мышей C57BL/6N возрастом 5 недель кормили MCD-рационом с поступлением 60% калорий из жиров (A06071302, Research Diets) (HFМCD-рацион), чтобы индуцировать НАСГ. Контрольные мыши получали обычный корм (NC, Specialty Feeds). Через 6 недель на HFМCD-рационе начинали вводить антитело против ИЛ-11 BSN-3С6 (10 мг/кг) каждые две недели в течение 4 недель. На 10 неделе собирали печень и сыворотку, и анализировали активацию ERK, содержание гидроксипролина в печени и уровни АЛТ в сыворотке, проводя измерения, как описано выше.

Результаты представлены на фиг. 40А-40С. Антитело против ИЛ-11, как было обнаружено, устраняет активацию ERK (40А) и ингибирует прогресс фиброза печени (40В) и уровни АЛТ в сыворотке (40С). КИ: кратность изменения.

Направленную против ИЛ-11 терапию изучали в другой модели НАСГ на продвинутой стадии. 2-дневным мышам C57BL/6 делали одну подкожную инъекцию 200 мкг стрептозотоцина и давали обычный корм в течение 4 недель. Затем мышей переводили на HFМCD-рацион на 7 недель, после чего параллельно с HFМCD-рационом проводили лечение 10 мг/кг антитела против ИЛ-11 BSN-3С6 или контрольного IgG 3× в неделю в течение последующих 7 недель. Измеряли экспрессию РНК генов фиброза и воспаления *Coll1a1*, *Coll1a2*, *Coll1a3*, *Timp1*, *Tgfb1*, *Mmp2*, *Tnfa*, *Ccl2* и *Ccl5*.

Результаты представлены на фиг. 40D. Направленная против ИЛ-11 терапия, как было обнаружено, надежно ингибирует экспрессию генов, характерную для фиброза и воспаления.

Соответственно, направленная против ИЛ-11 терапия ингибирует фиброз печени и повреждение печени.

14.2 Ингибирование активации миофибробластов с применением антител против ИЛ-11

Звездчатые клетки печени (HSC) играют важную роль в патогенезе НАСГ. Профибротические стимулы, например, TФР-β1, TРФ и провоспалительные факторы могут активировать HSC и трансформировать их в миофибробласты печени, сходные по свойствам с происходящими из фибробластов миофибробластами.

Клетки HSC обрабатывали стимулирующими НАСГ факторами в присутствии или в отсутствие ан-

титела против ИЛ-11 для исследования трансформации клеток HSC в миофибробласты.

Клетки HSC высевали в 96-луночные черные планшеты с плотностью 5×10^3 клеток на лунку и обрабатывали ТФР- β 1 (5 нг/мл), ТРФ (20 нг/мл), AngII (100 нМ), bFGF (10 нг/мл) или CCL2 (5 нг/мл) в присутствии контрольного IgG или клона антитела против ИЛ-11 BSN-3C6 в течение 24 ч. Затем клетки фиксировали в 4% параформальдегиде (ПФА, 28908, Thermo Fisher Scientific), пермеабилizировали 0,1% Triton X-100 (Sigma) и блокировали неспецифические сайты 0,5% БСА и 0,1% Tween-20 в ФСБ. Клетки инкубировали в течение ночи (4°C) с первичными антителами (1:500), а затем инкубировали с подходящими вторичными антителами с AlexaFluor 488 (1:1000). EdU-Alexa Fluor 488 встраивали с использованием набора для мечения Click-iT EdU Labelling Kit (C10350, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Клетки контр-окрашивали 1 мкг/мл DAPI (D1306, Thermo Fisher Scientific) в блокирующем растворе. Изображения для каждого условия получали для лунок в двух повторностях, минимум по 7 полей на лунку, в системе многопараметрической визуализации Operetta 1483 (PerkinElmer). Проводили количественное определение АСТА2⁺ve клеток с использованием Harmony v3.5.2 (PerkinElmer). Измерение интенсивности флуоресценции на зону коллагена I (нормированной по количеству клеток) выполняли с помощью Columbus 2.7.1 (PerkinElmer).

Обработка антителом против ИЛ-11, как было обнаружено, блокирует переход HSC в миофибробласты, запускаемый стимулирующими НАСГ факторами. Результаты представлены на фиг. 41А-41D. Репрезентативные флуоресцентные изображения показывают, что антитело против ИЛ-11 BSN-3C6 уменьшало количество АСТА2⁺ve клеток (41А) и продуцирование коллагена I клетками HSC (41В), деление масштабной шкалы = 200 мкм. Для каждого варианта обработки количественно определяли процент АСТА2⁺ve клеток (41С) и продуцирование коллагена I (41D), показывающие, что меньшее число обработанных клеток HSC были АСТА2-положительными или продуцировали коллаген, т.е. обработка антителами блокировала запускаемый стимулами переход клеток HSC в миофибробласты.

Эффект направленной против ИЛ-11 терапии на инвазивное поведение клеток HSC человека оценивали с использованием инвазионного анализа в 24-луночной камере Бойдена (Cell Biolabs Inc.). HSC предварительно обрабатывали клоном антитела против ИЛ-11 BSN-3C6 или контрольным IgG в течение 15 мин до добавления стимулов. Равные количества клеток HSC в не содержащей сыворотки среде HSC высевали в трех повторностях на покрытый ВКМ матригель и оставляли для инвазии в направлении среды HSC, содержащей 0,2% ФБС. Через 48 ч инкубации со стимуляторами инвазии ТРФ (20 нг/мл) или CCL2 (5 нг/мл) среду аспирировали и неинвазивные клетки удаляли с помощью ватного тампона. Клетки, демонстрирующие инвазию в направлении нижней камеры, окрашивали раствором для окрашивания клеток (Cell Biolabs), получали их изображения и подсчитывали при увеличении 40 \times .

Результаты представлены на фиг. 42. Было обнаружено, что антитело против ИЛ-11 предотвращает индуцированную ТРФ и CCL2 инвазию в матригель клеток HSC.

14.3 Блокирование передачи сигналов ИЛ-11 ингибирует воспаление печени при НАСГ

Помимо роли в фиброзе печени клетки HSC играют центральную роль в воспалении печени за счет секреции и паракринной активности провоспалительных цитокинов и хемокинов.

Было определено, что потеря функции ИЛ-11 приводила к стабильно более низким уровням маркеров воспаления TNF α , CCL2 и CCL5. Проводили исследование для определения связи эффектов на воспаление *in vivo* с действием ИЛ-11 на клетки HSC. Уровни CCL2 измеряли в ИФА ELISA в супернатантах HSC (n=4/группу) без стимула (-), с ИЛ-11 или с ТФР- β 1 в присутствии контрольного IgG или антитела против ИЛ-11 BSN-3C6; ИЛ-11 (5 нг/мл), ТФР- β 1 (5 нг/мл), IgG, BSN-3C6 (2 мкг/мл).

Результаты представлены на фиг. 43. Было обнаружено, что ИЛ-11 стимулировал секрецию CCL2 клетками HSC, тогда как ингибирование ИЛ-11 антителом против ИЛ-11 блокировало секрецию CCL2. Эти данные открывают неизвестную роль ИЛ-11, которую он играет в стромальном иммунитете, и показывают, что нейтрализация ИЛ-11 ингибирует паракринные эффекты провоспалительных фактором, секретируемых клетками HSC, на другие клетки в среде печени.

14.4 Нейтрализация передачи сигналов ИЛ-11 обращает фиброз печени

Тяжелый фиброз печени формировали у мышей путем кормления индуцирующим НАСГ MCD-рационом в течение 10 недель. Затем мышей переводили на обычный корм (NC) и проводили лечение антителом против ИЛ-11 BSN-3C6 (20 мг/кг) два раза в неделю в течение шести недель. Мышей на рационе NC на протяжении всего эксперимента и антитело IgG использовали в качестве контрольных. Содержание гидроксипролина в печени, т.е. общий коллаген, измеряли путем обнаружения согласно описанию выше.

Результаты представлены на фиг. 44А. Содержание коллагена в печени в значительной степени нормализовалось через три недели лечения антителом против ИЛ-11, и еще большая нормализация наблюдалась через шесть недель. Отметим, что содержание коллагена в печени не изменялось у получавших лечение контрольным IgG-антителом животных на протяжении всего эксперимента.

Обращению фиброза печени способствует старение трансформированных HSC или их переход в неактивное АСТА2⁻ve состояние. На фиг. 44В показано, что направленная против ИЛ-11 терапия, как было обнаружено, снижает экспрессию Acta2.

Для непосредственной проверки того, необходима ли передача сигналов ИЛ-11 для поддержания клеток HSC в трансформированном состоянии, клетки HSC стимулировали ТФР- β 1 или ТРФ в течение 72 ч, после чего обрабатывали антителом против ИЛ-11 BSN-3C6 в течение дополнительных 24 или 48 ч, продолжая стимуляцию ТФР- β 1 или ТРФ. Нестимулированные HSC использовали в качестве контроля без фиброза.

Результаты представлены на фиг. 44C. В пределах 24 ч после ингибирования передачи сигналов ИЛ-11 процент АСТА2⁺vc клеток восстанавливался почти до базовых уровней при стимуляции HSC либо ТФР- β 1, либо ТРФ. Количество секретируемого коллагена также восстанавливалось почти до базовых уровней.

Концентрацию MMP2 измеряли через 24 или 48 ч терапии антителом против ИЛ-11. Результаты представлены на фиг. 44D. Направленная против ИЛ-11 терапия снижала концентрацию MMP2 через 24 ч и восстанавливала концентрацию MMP2 почти до базовых уровней через 48 ч.

Соответственно, ингибирование ИЛ-11-зависимой трансформации HSC вызывает старение/восстановление HSC и благоприятное ремоделирование матрикса, что приводит к регрессу фиброза.

Изучали эффект направленной против ИЛ-11 терапии при НАСГ на ранней стадии. В модели индуцированного HFMCД-рационом НАСГ пиковое воспаление наблюдается через шесть недель, за ним следует фаза тяжелого фиброза. Мышей кормили HFMCД-рационом в течение 1 недели, а затем проводили лечение на протяжении следующих пяти недель на указанном рационе, два раза в неделю вводя по 10 мг/кг антитела против ИЛ-11 BSN-3C6 или контрольного IgG. Фосфорилирование ERK, содержание триглицеридов и уровни АЛТ в сыворотке оценивали согласно описанию выше. Ткани печени фиксировали в течение 48 ч при КТ в 10% нейтральном буферном растворе формалина (NBF), обезвоживали, заливали в парафиновый блок и готовили срезы толщиной 7 мкм. Срезы, окрашенные трихромом по Массону, изучали с применением световой микроскопии, деление масштабной шкалы: 100 мкм.

Результаты представлены на фиг. 45A-45E. Ингибирование передачи сигналов ИЛ-11 на ранних стадиях стеатогепатита с применением направленной против ИЛ-11 терапии, как было обнаружено, приводит к резкому уменьшению стеатоза в печени мышей (45A) и меньшей активации ERK (45B). На молекулярном уровне наблюдалось значимое снижение содержания триглицеридов (45C), а в печени мышей, получавших направленную против ИЛ-11 терапию, не наблюдались липидные капли, в отличие от получавших контрольный IgG мышей (45D). HFMCД-рацион индуцирует выраженный стеатогепатит и повреждение печени через одну неделю (АЛТ > 700 Ед/л), которые направленная против ИЛ-11 терапия дозозависимым образом обращала почти до нормального состояния через три недели (45E). У получавших направленную против ИЛ-11 терапию мышей не развивался фиброз в указанном эксперименте, что еще раз подтверждает выраженные антифибротические эффекты, ассоциированные с ингибированием передачи сигналов ИЛ-11.

Эффект направленного против ИЛ-11 лечения на экспрессию профибротических и провоспалительных генов в модели НАСГ на мышцах оценивали с применением RNA-seq и кПЦР.

Результаты представлены на фиг. 45F-45H. После лечения антителом против ИЛ-11 происходило прекращение стимулирующей регуляции профибротических и провоспалительных генов. Тепловая карта Z-оценок дифференциальной экспрессии профибротических и провоспалительных генов (число транскриптов на млн картированных ридов, ТРМ) показывает, что лечение антителом против ИЛ-11 обеспечивало экспрессию профибротических и провоспалительных генов, аналогичную наблюдаемой у мышей на контрольном рационе NC (без НАСГ) (45F). У мышей, которые получали лечение антителом против ИЛ-11, не наблюдалось стимулирующей регуляции ни одного из маркеров воспаления *Tnfa* и *Ccl2* (45G) или профибротических маркеров *Tgfb1*, *Acta2*, *Timp1*, *Col1a1*, *Col1a2* или *Col3a1* (45H).

Соответственно, нейтрализация передачи сигналов ИЛ-11 обращает повреждение печени при НАСГ на ранней стадии.

Таким образом, ИЛ-11 необходим для активации и трансформации HSC и играет центральную роль в патобиологии HSC. Нейтрализующие ИЛ-11 антитела демонстрируют болезнь-модифицирующее терапевтическое действие, превышающее как таковые антифибротические эффекты. Антитела к ИЛ-11 могли обращать активацию звездчатых клеток печени (HSC), зависимую от ТФР- β 1 или ТРФ. Ингибирование передачи сигналов ИЛ-11 предотвращает воспаление и стеатоз и может обращать фиброз печени и повреждение гепатоцитов на поздних стадиях заболевания. При более раннем проведении при стеатогепатите, направленная против ИЛ-11 терапия блокирует воспалительные сигналы от HSC и предотвращает повреждение гепатоцитов.

Пример 15. Ингибирование фиброза глаз с применением антител против ИЛ-11

Антифибротический эффект лечения антителом против ИЛ-11 оценивали в модели на мышках фиброза сетчатки, при котором разрушается мембрана Бруха, согласно описанию в источнике: Caballero et al., *Exp Eye Res.* (2009) Mar;88(3):367-77.

Вкратце, у мышей индуцировали лазером повреждение сетчатки (по 4 ожога на сетчатку), после чего проводили лечение путем внутриглазного введения антител (0,5 мкг либо контрольного IgG, либо клон антитела против ИЛ-11 BSN-3C6) на 1, 7, 14 дни и 21 день. На 28 день извлекали глаза для гисто-

логического анализа. Площадь зон фиброза в участках ожога измеряли с применением окрашивания трихромом по Массону.

Результаты представлены на фиг. 32А и 32В. Площадь зон фиброза была значительно выше у получавших лечение контрольным IgG мышшей по сравнению с получавшими лечение антителом против ИЛ-11 мышшами.

В отдельном эксперименте у мышшей (n=10) индуцировали ожог сетчатки лазером (по 4 участка на глаз) и лечили с использованием либо Eylea (афлиберцепт; Regeneron) + контрольный IgG, либо комбинированной терапии Eylea + BSN-3С6. Через 4 недели после травмы сетчатку окрашивали и количественно определяли коллаген (маскированное исследование).

Результаты представлены на фиг. 32С. Направленная против ИЛ-11 терапия, как было обнаружено, уменьшает площадь зон фиброза в глазу по сравнению с контрольным IgG. Таким образом, терапия против ИЛ-11 снижает фиброзный ответ в контексте направленной против ФРЭС терапии.

Оценивали хороидальную неоваскуляризацию (CNV), используя ангиографию глазного дна с флуоресцеином. Очаги CNV отслеживали через 7 и 28 дней после индуцированного лазером разрыва мембраны Бруха.

Результаты представлены на фиг. 32D. Измерения отражают степень CNV на основании кратности изменения площади зон просачивания до и после интравитреальных инъекций (И/В) антител. Направленная против ИЛ-11 терапия снижала кратность изменения площади зон просачивания.

Пример 16. Ингибирование фиброза кожи с применением антител против ИЛ-11

Антифибротический эффект лечения антителом против ИЛ-11 анализировали в модели фиброза кожи на мышшах, формируемого путем подкожной инъекции блеомицина (BLM, Sigma B2434, 50 мкг/день).

Вкратце, шерсть на участке посередине спины у мышшей (~9 см²) состригали ножницами и использовали крем для депиляции для полного удаления шерсти. Выполняли подкожные инъекции 100 мкл блеомицина, разведенного в ФСБ до концентрации 0,5 мг/мл, в верхнюю половину сайта инъекции. Затем выполняли подкожные инъекции 60 мкл клона антитела против ИЛ-11 BSN-3С6 или контрольного IgG-антитела в нижнюю половину сайта инъекции (дозировка = 15 мг/кг/день). Инъекции выполняли ежедневно на протяжении 21 дня; животных умерщвляли через день после последней инъекции и проводили гистологический анализ толщины кожи и содержания коллагена (путем окрашивания трихромом по Массону). На фиг. 33А приведено схематическое представление экспериментальных процедур для разных групп лечения.

На фиг. 33В и 33С показано, что толщина кожи была значимо снижена у мышшей, получавших лечение нейтрализующим антителом против ИЛ-11, по сравнению с получавшими лечение контрольным IgG мышшами. В получавшей лечение контрольным IgG группе также наблюдалось повышенное окрашивание коллагена (фиг. 33В, средняя панель).

Пример 17. Ингибирование фиброза сердца с применением антител против ИЛ-11

Антифибротический эффект лечения антителом против ИЛ-11 анализировали в модели фиброза сердца на мышшах.

Вкратце, выполняли поперечное сужение аорты (ТАС) у самцов мышшей согласно существующему описанию (Tarnavski, O. et al. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol. Genomics* 16, 349-360 (2004)). У совпадающих по возрасту мышшей проводили ложную операцию без ТАС. Проводили трансторакальную двумерную доплеровскую эхокардиографию для подтверждения повышенных значений перепада давления (>40 мм рт.ст.), которые указывают на успешность ТАС.

Мышей умерщвляли через 2 недели после ТАС для проведения гистологической и молекулярной оценки. Клон антитела против ИЛ-11 BSN-3С6 или контрольное IgG-антитело вводили внутривентриально 3 раза в неделю в дозе 20 мг/кг. Через две недели собирали сердца и оценивали степень фиброза с применением набора для окрашивания трихромом по Массону (HT15, Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты анализа представлены на фиг. 34. Было обнаружено, что у мышшей, получавших лечение нейтрализующим антителом против ИЛ-11, наблюдаются пониженные уровни фиброза в эпикарде, эндокарде и периваскулярных областях по сравнению с мышшами, получавшими лечение контрольным IgG-антителом.

Пример 18. Варианты клонов антитела против ИЛ-11

Остаток цистеина в положении 91 последовательностей варибельной области легких цепей, представленных в SEQ ID NO: 7, 9 и 11, заменяли на A, G, I, L, Q, S, T или V. Варианты последовательностей варибельной области легких цепей представлены в SEQ ID NO: 12-35.

Клетки HEK293 EBNA трансфицировали векторами, кодирующими scFv, соответствующими YU100-H01, 01A, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01T, 01V, YU100-G08, 02A, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02T или 02V.

Пример 19. Анализ аффинности связывания вариантов клонов с ИЛ-11

Варианты клонов антитела против ИЛ-11 01 и 02, описанные в примере 18, анализировали на аффинность связывания с ИЛ-11 человека в одноцикловом кинетическом анализе с использованием ВІАscore T200.

Вкратце, рекомбинантный ИЛ-11 человека иммобилизовали на чипе СМ5 и проводили связывание, проводя по чипу очищенные антитела против ИЛ-11, соответствующие разным клонам в формате IgG1, в возрастающих концентрациях со скоростью потока 30 мкл/мин без этапа диссоциации между запусками. Проводили одноэтапную диссоциацию и регенерировали поверхность с применением 3,8 М MgCl₂.

Для связывания вариантов клонов YU100-G08 и 02 использовали следующие концентрации антител: 3,125, 6,25, 12,5 и 25 нМ. Для вариантов YU100-H01 и 01 использовали следующие концентрации антител: 37,5, 75, 150 нМ.

Для вариантов YU100-G08 и 02 время введения аналитов составляло 150 с, а для вариантов YU100-H01 и 01 время введения аналитов составляло 400 с.

Для вариантов YU100-G08 и 02 время диссоциации аналита составляло 500 с, а для вариантов YU100-H01 и 01 время диссоциации аналита составляло 700 с.

Анализ полученных необработанных данных проводили с использованием программного обеспечения для анализа ВІАscore T200 V3.0, аппроксимируя данные после вычитания фона моделью взаимодействия 1:1.

Результаты, полученные для вариантов YU100-G08 и 02, представлены на фиг. 35А-35J. Варианты 02А, 02I, 02L, 02Q и 02S продемонстрировали более высокую аффинность связывания с ИЛ-11 человека, чем YU100-G08, или аффинность в пределах двукратных значений аффинности YU100-G08.

Результаты, полученные для YU100-H01 и вариантов 01, представлены на фиг. 36А-36J. Варианты 01А, 01I, 01L и 01Т продемонстрировали более высокую аффинность связывания с ИЛ-11 человека, чем YU100-H01, или аффинность в пределах двукратных значений аффинности YU100-H01.

Пример 20. Анализ ингибирования опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов для вариантов клонов

Варианты 01 и 02 клонов антитела против ИЛ-11, описанных в примере 18, анализировали на способность ингибировать опосредованную ИЛ-11 передачу сигналов в анализе *in vitro*.

Кардиальные фибробласты предсердий человека культивировали в лунках 96-луночного планшета в присутствии ТФР-β1 (5 нг/мл) в течение 24 ч, в присутствии антител YU100-H01, 01А, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01Т, 01V, YU100-G08, 02А, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02Т или 02V против ИЛ-11 в разных концентрациях в формате scFv-IgG1-Fc человека.

Затем измеряли уровни профибротического маркера MMP2 в супернатанте клеточной культуры в ИФА ELISA. Измеряли базальную секрецию MMP2 клетками в культуре, культивируя их в отсутствие ТФР-β1.

Определенные уровни MMP2 использовали для получения значений IC50 для ингибирования опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов разными клонами.

Результаты для YU100-H01, 01А, 01G, 01I, 01L, 01Q, 01S, 01Т и 01V представлены на фиг. 37А-37I. Результаты для YU100-G08, 02А, 02G, 02I, 02L, 02Q, 02S, 02Т и 02V представлены на фиг. 38А-38I.

12.3 Межвидовая перекрестная реактивность

Фибробласты кожи макака стимулировали с рекомбинантным ИЛ-11 макака (5 нг/мл) в течение 24 ч в присутствии контрольного IgG, антител YU100-G08_02А или 3С6 в концентрации 2 мкг/мл. Коллаген, клетки АСТА2^{+ve} и EdU^{+ve} количественно определяли с использованием платформы для многопараметрической визуализации Operetta. Секретированный коллаген количественно определяли с применением калориметрического анализа на коллаген с красителем сириус красный.

Результаты представлены на фиг. 38J-38М. Оба антитела блокировали передачу сигналов ИЛ-11 в фибробластах макака. 3С6 также тестировали на фибробластах сердца крысы и свиньи; и, как было обнаружено, оно ингибировало фиброзный ответ в указанных клетках.

Пример 21. ИЛ-11 и фиброз легких

Идиопатический фиброз легких (ИФЛ) представляет собой фиброзное заболевание легких, характеризующееся наличием инвазивных легочных миофибробластов, откладывающих компоненты внеклеточного матрикса, например, коллаген, и нарушающих целостность легких.

Проводили иммуноокрашивание срезов легких от здоровых индивидуумов и пациентов с ИФЛ на ИЛ-11 и альфа-актин гладких мышц (АСТА2), маркер миофибробластов. Ткани ИФЛ человека получали от пациентов с ИФЛ после трансплантации легкого, а нормальные контрольные ткани легкого человека получали из НАМ (Международного института развития медицины). Ткань легких человека фиксировали в 10% формалине в течение ночи и заливали в парафин. Срезы ткани инкубировали с первичными антителами (против ИЛ-11 (PA5-36544, ThermoFisher Scientific), против АСТА2 (ab7817 и ab5694, abcam) в течение ночи и визуализировали с использованием набора для обнаружения с полимерным конъюгированным с HRP антителом против IgG кролика ImmPRESS (Vector Laboratories) и субстратом пероксидазы ImmPACT DAB Peroxidase Substrate (Vector Laboratories).

Результаты представлены на фиг. 46А. ИЛ-11, как было обнаружено, экспрессируется в нормальной

ткани легких на низком уровне, но в образцах легких с ИФЛ его экспрессия значимо повышена, как и уровни АСТА2.

Исследовали роль ИЛ-11 для активации, миграции или инвазии фибробластов легких. Фибробласты легких мыши инкубировали с рекомбинантным ИЛ-11 мыши (5 нг/мл, 24 ч) и количественно определяли общий секретированный коллаген в супернатанте обработанных ИЛ-11 фибробластов в анализе на коллаген с красителем сириус красный (n=5/группу). Фибробласты культивировали в не содержащей сыворотки среде DMEM в течение 24 ч до анализа миграции или инвазии клеток. Равные количества фибробластов в не содержащей сыворотки среде DMEM высевали в двух повторностях в апикальные камеры, содержащие поликарбонатные мембраны, для анализов миграции, или на покрытый ВКМ матригель для анализов инвазии. Фибробластам позволяли мигрировать в направлении ИЛ-11 или ТФР- β 1 в качестве хемоаттрактантов. Для анализов инвазии фибробласты оставляли для инвазии в направлении DMEM, содержащей 2% ФБС. Через 24 ч инкубации при 37°C среду удаляли и немигрирующие или неинвазивные клетки извлекали с помощью ватных тампонов. Клетки, которые мигрировали или проникали в нижнюю камеру, окрашивали раствором для окрашивания клеток (Cell Biolabs Inc.). Для мигрирующих клеток проводили колориметрическую количественную оценку при 540 нм. Инвазивные клетки из 5 перекрывающихся полей зрения для каждой мембраны визуализировали и подсчитывали при 40-кратном увеличении.

Результаты представлены на фиг. 46B (секретированный коллаген), 46C (миграция) и 46D (инвазия). ИЛ-11 индуцировал выраженную активацию, пролиферацию, продуцирование ВКМ, миграцию и инвазию фибробластов.

Соответственно, в легких при ИФЛ происходит стимулирующая регуляция ИЛ-11, который запускает трансформацию фибробластов в миофибробласты и индуцирует фиброз.

21.1 Направленная против ИЛ-11 терапия и фиброз легких

Антитела против ИЛ-11 получали согласно описанию ранее.

Кинетику связывания антитела против ИЛ-11 BSN-3C6 с ИЛ-11 человека и мыши в реальном времени измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в системе VIAcore T200 (GE Healthcare, США). Связывание и диссоциацию измеряли в течение 250 и 500 с соответственно.

Равновесную константу связывания K_D определяли на основании отношения констант скорости связывания k_d/k_a .

Результаты представлены на фиг. 47A и 47B. Для связывания BSN-3C6 с ИЛ-11 человека наблюдалась $K_D = 4,14$ нМ (47A), а для связывания BSN-3C6 с ИЛ-11 мыши наблюдалась $K_D = 2,38$ нМ (47B).

Оценивали эффекты антитела против ИЛ-11 BSN-3C6 на характеристики фиброза.

Фибробласты легких мыши обрабатывали совокупностью профибротических стимулов в присутствии BSN-3C6 или контрольного IgG-антитела. Проводили иммуноокрашивание клеток, как и ранее, на Acta2 и Col1 α 1 (AT против АСТА2 (ab7817 и ab5694, abcam), против COL1A1 (ab34710, abcam)) и количественно определяли иммунофлуоресценцию. Секретированный коллаген в супернатанте клеточной культуры количественно определяли с применением набора для обнаружения коллагена с красителем сириус красный.

Результаты представлены на фиг. 48A. Тепловые карты отражают количественное определение с использованием иммунофлуоресценции Acta2^{+ve} клеток; иммуноокрашивание Col1 α 1 (интенсивность/площадь) в фибробластах легких мыши, обработанных совокупностью профибротических стимулов, было слабее в присутствии антитела против ИЛ-11 по сравнению с контрольным IgG. Секреция коллагена в культуральной супернатант была снижена в присутствии антитела против ИЛ-11.

Дифференцировавшие под действием ТФР- β 1 фибробласты легких человека (5 нг/мл, предварительная обработка за 24 ч) обрабатывали BSN-3C6 или контрольным IgG-антителом (2 мкг/мл, 24 ч). Определяли процент АСТА2^{+ve} клеток, иммуноокрашивание COL1 α 1 (интенсивность/площадь) и секрецию коллагена.

Результаты представлены на фиг. 48B. Антитело против ИЛ-11, как было обнаружено, снижает активацию фибробластов, продуцирование COL1 α 1 и секрецию коллагена в преактивированных фибробластах легких человека, демонстрируя таким образом, что направленная против ИЛ-11 терапия может обеспечивать обращение фиброза.

Первичные фибробласты человека и мыши стимулировали видоспецифическим рекомбинантным ТФР- β 1 (5 нг/мл, 24 ч) и отслеживали уровни секретированного MMP2 в присутствии очищенного антитела против ИЛ-11 BSN-3C6 (6 мкг/мл).

Результаты представлены на фиг. 48C (человек) и 48D (мышь). Антитело против ИЛ-11 эффективно ингибирует запускаемую ТФР- β 1 секрецию профибротического маркера MMP2 и фибробластами человека, и фибробластами мыши путем нейтрализации зависимой от ИЛ-11 аутокринной петли.

Исследовали эффекты антитела против ИЛ-11 BSN-3C6 на индуцированную ТФР- β 1 миграцию или инвазию фибробластов легких мыши. Фибробласты предварительно обрабатывали антителом против ИЛ-11 BSN-3C6 или контрольными IgG-антителами в течение 15 мин до добавления хемоаттрактантов.

Результаты представлены на фиг. 48E. Антитело против ИЛ-11, как было обнаружено, снижает как

миграцию, так и инвазию.

Таким образом, антитело против ИЛ-11 BSN-3С6, как было обнаружено, блокирует активацию фибробластов и продуцирование ВКМ, и ингибирует инвазию и миграцию фибробластов, зависимые от совокупности стимулов. Также было обнаружено, что антитело против ИЛ-11 ингибирует разнообразные фиброзные фенотипы фибробластов легких, происходящих от пациентов с ИФЛ, после стимуляции ТФР-β1.

Важно отметить, что направленная против ИЛ-11 терапия была способна не только предотвращать или ингибировать фиброз, но также и обеспечивать обращение фиброзных фенотипов сформировавшихся популяций трансформированных под действием ТФР-β1 миофибробластов легких (фиг. 48В).

21.2 Направленная против ИЛ-11 терапия предотвращает фиброз легких

Исследовали потенциальную способность направленной против ИЛ-11 терапии предотвращать фиброз легких исследовали в модели ИФЛ на мышах.

Измеренное время полужизни антитела против ИЛ-11 BSN-3С6 в крови мышей составляло ~9 дней при использовании только что меченого [¹²⁵I]BSN-3С6 (4,2 мкКи/2,5 мкг/100 мкл) в ФСБ. Антитело вводили путем ретроорбитальных инъекций, мышей анестезировали 2% изофлураном и собирали кровь в нескольких точках времени: 2, 5, 10, 15, 30 мин, 2, 6, 8 ч и 2 дня после инъекции из поднижнечелюстной вены.

Самкам мышей C57BL/6 дикого типа возрастом 8-10 недель позволяли акклиматизироваться в течение одной недели до введения блеомицина (BLM). На 7, 9, 11, 14, 16, 18 дни мышам вводили антитело против ИЛ-11 BSN-3С6 (20 мг/кг, в ФСБ) посредством внутривентральных инъекций; на 21 день после стимуляции BLM собирали легкие. Срезы легких из группы лечения антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG окрашивали трихромом по Массону: срезы обрабатывали фиксирующей смесью Буэна, бибрихским кислотным алым/фуксином и дифференцировали в 5% фосфомолибденовой /фосфорновольфрамовой кислоте, контр-окрашивали в 2,5% анилиновом синем и дополнительно дифференцировали в 1% уксусной кислоте. Общее содержание гидроксипролина в легких (правая верхняя доля) мышей измеряли с использованием набора для анализа на общий коллаген Quickzyme Total Collagen Assay Kit (Quickzyme Biosciences). Экспрессию Col3a1, фибронектина и уровни белка ИЛ-11, а также статус фосфорилирования и общие уровни Erk и Stat3 в гомогенатах легких детектировали с применением вестерн-блоттинга и визуализировали с использованием системы обнаружения ECL (Pierce). Экспрессию мРНК в лизатах легких количественно определяли с помощью 40 циклов РВ-ПЦР и нормировали по экспрессии ГАФДГ. Зонды TaqMan получали от Thermo Fisher Scientific (Col1a1, Mm00801666_g1; Col1a2, Mm00483888_m1; Col3a1, Mm01254476_m1; Fn1, Mm01256744_m1; Mmp2, Mm00439498_m1; Timp1, Mm01341361_m1; Gapdh, Mm99999915_g1).

Результаты представлены на фиг. 49А-49D. Легкие мышей, получавших лечение антителом против ИЛ-11, были в меньшей степени поражены фиброзом (49А). Мыши, получавшие направленную против ИЛ-11 терапию, как было обнаружено, характеризовались сниженными массой легких/тела и содержанием гидроксипролина в легких (49В), а также пониженной экспрессией белков коллагена Col3a1 и фибронектина (49С) по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольным IgG. Лечение антителом против ИЛ-11, как было обнаружено, снижает экспрессию РНК маркеров фиброза. Кроме того, также было обнаружено, что у получавших лечение антителом против ИЛ-11 мышей развивался профиль экспрессии РНК, обеспечивающий преимущественное ремоделирование ВКМ, способствующее разложению фибриллярного коллагена и устранению фиброза (49D). Блокирование передачи сигналов ИЛ-11, как было обнаружено, снижает неканоническую передачу сигналов ИЛ-11 (активацию Erk), тогда как каноническая передача сигналов (Stat3) не изменяется (49Е).

21.3 Направленная против ИЛ-11 терапия обращает фиброз легких

Исследовали потенциал направленной против ИЛ-11 терапии для лечения и обращения фиброза легких в модели индуцированного BLM ИФЛ на мышах.

Мышам инъецировали антитело против ИЛ-11 BSN-3С6 (20 мг/кг, через день) или контрольный IgG, начиная с 14 дня (позднее вмешательство) после введения BLM, когда уровни коллагена выходят на плато. Оценку легких проводили согласно описанию выше на 28 день после введения BLM.

Результаты представлены на фиг. 50А-50D. В легких мышей, получавших лечение антителом против ИЛ-11, наблюдался регресс фиброза по сравнению с получавшими контрольный IgG мышами (50А). у мышей, получавших направленную против ИЛ-11 терапию, как было обнаружено, были снижены масса легких/масса тела и содержание гидроксипролина в легких (50В). Уровни белка Col3a1 и фибронектина, как и уровни ИЛ-11, значительно уменьшала направленная против ИЛ-11 терапия (50С). Блокирование передачи сигналов ИЛ-11, как было обнаружено, снижает неканоническую передачу сигналов ИЛ-11 (активацию Erk), тогда как каноническая передача сигналов (Stat3) не изменялась (50D).

Таким образом, нейтрализация передачи сигналов ИЛ-11 с применением антитела против ИЛ-11 блокирует фиброзный ответ в фибробластах легких и обращает активацию трансформированных ТФР-β1 миофибробластов. В модели ИФЛ на мышах при выраженной стимулирующей регуляции ИЛ-11 проведение направленной против ИЛ-11 терапии на раннем или позднем этапе после стимула BLM приводило к предотвращению или обращению фиброза легких соответственно.

Пример 22. Эффект ИЛ-11 на фиброз поджелудочной железы

100 мкг/кг рекомбинантного ИЛ-11 мышам или солевого раствора подкожно инъецировали мышам ежедневно в течение 21 дня. Затем оценивали содержание коллагена в поджелудочной железе с использованием калориметрического анализа содержания гидроксипролина.

Результаты представлены на фиг. 52. ИЛ-11 индуцирует продуцирование коллагена в поджелудочной железе. Таким образом, при фиброзе поджелудочной железы терапия антителами против ИЛ-11 будет оказывать благоприятное действие.

Пример 23. Эффект антител против ИЛ-11 на истощающие расстройства

У животных на HFМCD-рационе происходит снижение массы тела и сильно ухудшается состояние здоровья, см. также пример 14. Ингибирование передачи сигналов ИЛ-11 смягчает индуцированное HFМCD снижение массы тела, а для антитела 9А7 продемонстрирован дозозависимый эффект на снижение массы тела.

Самцов мышей возрастом 5 недель кормили либо HFМCD-рационом, либо обычным кормом (NC) как и ранее на протяжении одной недели для индуцирования истощения, что приводило к ~15% снижению массы тела у мышей MCD. По окончании первой недели мышам два раза в неделю внутривентриально инъецировали 0,5, 1, 5 или 10 мг/кг антитела против ИЛ-11 YU100-G08_02A или 3С6. 10 мг/кг изотипического IgG-антитела использовали в качестве контроля. Массу тела и потребление пищи измеряли еженедельно. Для оценки потребления пищи измеряли средний уровень поглощенной пищи (г/мышь/неделю) из кормушек в клетках (n=3 мышам на клетку).

Результаты представлены на фиг. 53А и 53В. Терапия антителами против ИЛ-11 (53А) YU100-G08_02A и (53В) 3С6, как было обнаружено, обеспечивает дозозависимое увеличение массы тела и потребления пищи, что указывает на обращение истощения. Для самых высоких доз продемонстрирован максимальный эффект обращения истощения. Мыши, которых кормили рационом NC, уверенно набирали вес, тогда как у мышей, получавших HFМCD-рацион и лечение контрольным IgG, происходило снижение массы тела ~30% на протяжении курса лечения. Самые высокие дозы оказывали максимальный эффект на потребление пищи, при этом у мышей, получавших лечение контрольным IgG, наблюдалось незначительное снижение потребления пищи.

Острое заболевание, например травма или сепсис, может также быть ассоциировано с истощением, например анорексией и кахексией, поэтому в дальнейшем авторы настоящего изобретения исследовали эффекты антагонизма опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов на анорексию и кахексию исследовали в моделях острого повреждения почек на мышах.

Повреждение почек индуцировали путем в/б инъекции фолиевой кислоты (180 мг/кг) в основе (0,3 М NaHCO₃) 10-недельным самцам мышам; контрольным мышам вводили только основу. Животных умерщвляли через 28 дней после инъекции. Мышам внутривентриально инъецировали каждые 3 дня 20 мг/кг антитела против ИЛ-11 или изотипический контрольный IgG в идентичной концентрации, начиная за 1 ч до введения фолиевой кислоты и до умерщвления мышам.

Было обнаружено, что индуцированное фолатами повреждение почек приводило к быстрому ассоциированному с анорексией/кахексией снижению массы тела, ассоциированному с острой фазой тяжелого двустороннего повреждения почек. У мышам (n=7/группу), получавших терапию антителом против ИЛ-11 в момент повреждения и на протяжении периода повреждения, восстановление массы тела происходило быстрее по сравнению с группой контрольного IgG, и масса тела возвращалась к нормальной или почти нормальной через 3 недели.

Отдельно индуцируют повреждение почек, как и ранее, путем в/б инъекции фолиевой кислоты. Мыши получают лечение антителом против ИЛ-11 или контрольным IgG только с 21 дня после повреждения почек. Массу тела животных оценивают до и после лечения антителом. Здоровых мышам, которые не получали фолиевую кислоту, использовали в качестве контроля.

На фиг. 53С показано, что у мышам, получавших лечение антителом против ИЛ-11, начинала восстанавливаться масса тела после начала лечения, что указывает на возможность улучшения при ассоциированном с истощением снижении массы тела на поздних стадиях заболевания.

Пример 24. Эффект антител против ИЛ-11 на метаболические расстройства

Эффект антитела против ИЛ-11 изучают на мышах с метаболическими заболеваниями, такими как ожирение и диабет II типа. Западный рацион с фруктозой (WDF) используют для формирования метаболических расстройств, в значительной степени напоминающих расстройства у человека при ожирении, диабете II типа и неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) (Baena et al., Sci Rep (2016) 6: 26149, Machado et al., PLoS One (2015) 10:e0127991). Мышам кормят западным рационом (D12079B, Research Diets) с добавлением 15% (мас./об.) фруктозы в питьевую воду (WDF) на протяжении 16 недель, начиная с 12-недельного возраста. Контрольные субъекты получают обычный корм (NC, Specialty Feeds) и питьевую воду. IgG-антитело используют в качестве контроля.

У получавших лечение антителом против ИЛ-11 мышам на рационе WDF наблюдается значимое снижение массы тела (А) и жировой массы тела (В) по сравнению с получавшими лечение контрольным IgG-антителом мышами на рационе WDF. У мышам, получавших лечение антителом против ИЛ-11, также наблюдается увеличение безжировой массы тела по сравнению с получавшими лечение контрольным

IgG-антителом мышами, что указывает на восстановление в результате ингибирования передачи сигналов ИЛ-11 мышечной массы при индуцированном WDF метаболическом патогенезе. Кроме того, результаты внутрибрюшинного теста на толерантность к глюкозе (ipGTT) показывают, наряду с уровнями глюкозы натощак, значимое повышение толерантности к глюкозе у мышей, получавших лечение антителом против ИЛ-11.

Анализ расширяют для изучения эффектов на поджелудочную железу. Обнаружено, что у мышей на рационе WDF, получавших антитело против ИЛ-11, наблюдается выраженная защита от индуцированной WDF атрофии поджелудочной железы независимо от периода лечения, либо с 8 до 16 недели (для защиты от эффектов, ассоциированных с метаболическим заболеванием), или с 16 до 24 недели (для обращения эффектов, ассоциированных с метаболическим заболеванием) по сравнению с получавшими лечение контрольным IgG-антителом мышами.

У получавших антитело против ИЛ-11 мышей на рационе WDF значимо снижены уровни холестерина в сыворотке по сравнению с получавшими лечение контрольным IgG-антителом мышами на рационе WDF, а у получавших антитело против ИЛ-11 мышей на рационе WDF были значимо снижены уровни триглицеридов в сыворотке по сравнению с получавшими лечение контрольным IgG-антителом мышами на рационе WDF. У получавших антитело против ИЛ-11 мышей на рационе WDF значимо снижены уровни глюкозы в крови натощак по сравнению с получавшими лечение контрольным IgG-антителом мышами на рационе WDF.

Иммуногистологическое исследование поджелудочной железы обнаруживает усиление окрашивания глюкагона и инсулина в островках поджелудочной железы наряду с островковой гиперплазией у получавших лечение IgG мышей на рационе WDF, то есть классические признаки диабета II типа (Bonner-Weir and O'Brien Diabetes (2008) 57:2899-2904). Лечение антителом против ИЛ-11 у мышей на рационе WDF с 16 до 24 недели значительно уменьшает островковую гиперплазию и окрашивание глюкагона, а также улучшает экспрессию инсулина в островках мышей на рационе WDF, что предполагает, что антагонизм опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов подходит для улучшения при метаболических заболеваниях, вызванных рационом западного типа, и их обращения.

Модель HFMCД характеризуется ранним началом стеатогепатита с последующим фиброзом. Однако в указанной модели отсутствует ожирение или инсулинорезистентность. Модель индуцированного WDF НАСГ используют для тестирования эффектов направленной против ИЛ-11 терапии в контексте ожирения, инсулинорезистентности и диабета. Мышей кормят WDF в течение 16 недель, за указанное время у них развивалось ожирение и инсулинорезистентность со стеатозом, воспалением и фиброзом печени. После этого начинают лечение антителом против ИЛ-11. При нацеливании на передачу сигналов ИЛ-11 в пораженной НАСГ печени происходит ингибирование активации печеночной Erk (например, фиг. 40A). Несмотря на аналогичное увеличение массы тела, у мышей, получавших направленную против ИЛ-11 терапию, наблюдается обращение фиброза печени, снижение стеатоза, воспаления и уровней АЛТ в сыворотке. Это сопровождается снижением уровней глюкозы, триглицеридов и холестерина в сыворотке. Нейтрализующая ИЛ-11 терапия устраняет патологические признаки НАСГ, индуцированного WDF.

Тяжелый фиброз печени формируют, используя HFMCД в течение 10 недель, после чего мышей переводят на обычный корм, для имитации устойчивого метаболического вмешательства, и параллельно начинают лечение антителом против ИЛ-11.

После устранения метаболического стимула, как обнаружено, происходит медленный регресс активации Erk, который усиливается при лечении антителом. В отношении фиброза у получавших лечение IgG животных изменений не происходит на протяжении всего эксперимента, что предполагает, что полная метаболическая коррекция сама по себе не обращает фиброз, или обращает фиброз очень медленно. Напротив, содержание коллагена в печени в значительной степени нормализуется на ранних стадиях лечения антителом, с дальнейшей нормализацией на более поздних стадиях, что указывает на прогрессирующий продолжительный эффект.

Регресс фиброза ассоциирован с более низкими уровнями TIMP и более высокими уровнями MMP, которые способствуют благоприятному ремоделированию матрикса. В соответствии с этим, как обнаружено, у мышей с тяжелым фиброзом, получавших лечение антителом против ИЛ-11, происходит быстрая стимулирующая регуляция Mmp2 и понижающая регуляция Timp1. Обращению фиброза печени способствует апоптоз, старение и/или переход в неактивное АСТА2^{-ve} состояние трансформированных клеток HSC. Для проверки необходимости ИЛ-11 для поддержания клеток HSC в трансформированном состоянии HSC стимулируют ТФР-β1 или ТРФ с последующим ингибированием передачи сигналов ИЛ-11. В пределах 24 ч после начала ингибирования ИЛ-11 процент АСТА2^{+ve} клеток и количество секретируемого коллагена возвращаются практически к базовым уровням, а активность ERK в значительной степени снижается, несмотря на продолжающуюся стимуляцию ТФР-β1/ТРФ.

Пример 25. Эффект ингибирования передачи сигналов ИЛ-11 при гепатотоксичности 25.1 Эффект направленной против ИЛ-11 терапии на гепатотоксичность

ИЛ-11 непосредственным образом вызывает смерть гепатоцитов и запускает дисфункциональный

частичный эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) гепатоцитов, который, как известно, ограничивает способность печени к регенерации (Grant Rowe et al. *Molecular and Cellular Biology* 2011; 31 (12): 2392-2403). Первичные гепатоциты человека, как было обнаружено, на высоком уровне экспрессируют рецептор ИЛ-11R α , стимуляция ИЛ-11, как было обнаружено, индуцирует дозозависимую смерть гепатоцитов, на что указывает прогрессирующее увеличение уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ) при использовании физиологически релевантного диапазона доз, а стимуляция гепатоцитов человека H₂O₂ приводит к 10-кратной стимулирующей регуляции ИЛ-11 в супернатанте.

Модель индуцированного ацетаминофеном (АРАР) повреждения печени на мышах используют для исследования эффекта направленной против ИЛ-11 терапии на гепатотоксичность. Самцам мышей возрастом 12-14 недель натошак внутрибрюшинно (в/б) инъекцируют 10 мг/кг антитела против ИЛ-11 или изотипического контрольного IgG за 16 ч до инъекции (в/б, 400 мг/кг) АРАР. Мышей умерщвляли через 24 ч после введения АРАР. Уровни ИЛ-11 в сыворотке мышей и супернатанте гепатоцитов количественно определяют. Образцы печени препарируют и фиксируют в течение 48 ч при комнатной температуре в 10% нейтральном буферном растворе формалина (NBF), обезживают, заливают в парафиновый блок и готовят срезы толщиной 7 мкм. Срезы окрашивают гематоксилином/эозином (ГЭ) в соответствии со стандартным протоколом и изучают с применением световой микроскопии.

Обнаружено, что у мышей, получавших антитело против ИЛ-11, наблюдаются более низкие уровни АЛТ, то есть меньшее повреждение печени, и предотвращение индуцированного АРАР снижения массы печени, которое отражает разрушение клеток печени. Получавшие лечение антителом мыши также, как обнаружено, отличаются нормальными подвижностью и активностью, в отличие от получавших лечение контрольным IgG мышей, которые, как было обнаружено, сохраняли неподвижность /находились в агональном состоянии с видимыми признаками ухудшения состояния здоровья (такими как пилоэрекция, сгорбленная поза).

Обнаружено, что ингибирование передачи сигналов ИЛ-11 путем блокирования ИЛ-11 предотвращает гепатотоксичность в принятой трансляционной модели индуцированного АРАР повреждения печени (лекарственно-индуцированное повреждение печени; DILI).

Серьезно превышенную дозу АРАР (400 мг/кг) или эквивалентный объем солевого раствора вводят самцам мышей в возрасте 12-14 недель путем в/б инъекции, а через 10 ч мышам вводили в/б 20 мг/кг антагонистического антитела против ИЛ-11, совпадающего по изотипу контрольного IgG-антитела, или оставляли без лечения. Антитело против ИЛ-11 при введении через 10 ч после серьезно превышенной дозы АРАР, как было показано, восстанавливает макроскопическую морфологию печени как у мышей, не получавших АРАР. Также у мышей, получавших лечение антителом против ИЛ-11, восстанавливается функция печени. Продемонстрировано, что антагонистическое антитело - ингибитор опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов при введении через 10 ч после летально превышенной дозы АРАР устраняет ассоциированное с DILI ингибирование функции печени у мышей. Предположительно 10 ч после введения превышенной дозы у мышей эквивалентны приблизительно 24 ч у человека.

Пример 26. Выбор изотипа

Клоны YU100-G08_02A, 3C6 VH2.2/VL2.2 и 3C6 VH2.2/VL2.1 получали в форматах IgG1 и IgG4 человека. Вариант IgG4 содержит двойную мутацию S241P L248E (нумерация по Kabat). Мутация S241P стабилизирует шарнир, тогда как мутация L248E дополнительно снижает и так низкую эффекторную АЗКЦ-функцию IgG4 (Davies and Sutton, *Immunol Rev.* 2015 Nov; 268(1): 139-159; Angal et al *Mol Immunol.* 1993 Jan;30(1):105-8). Более низкая АЗКЦ-активность может быть благоприятной для подкожного введения антитела.

Проводили исследования принудительного разложения для изучения эффектов окисления и дезамидирования на целостность антител YU100-G08_02A. Исследование принудительного окисления с применением 0,5% (по объему) H₂O₂ показало, что YU100-G08_02A (IgG4) не подвержено эффектам окисления, исходя из результатов микрокапиллярного зонального электрофореза (микро-CZE), тогда как YU100-G08_02A в формате IgG1 указанное воздействие незначительно повреждало. Анализы ЭХ-ВЭЖХ для обоих клонов указывают на стабильность клон IgG4 после окислительной обработки, тогда как клон IgG1, как оказалось, частично распадается на легкие и тяжелые цепи. При обработке антител 1% (мас./об.) бикарбонатом аммония наблюдалось дезамидирование YU100-G08_02A (IgG4), однако на целостность антитела это не влияло. YU100-G08_02A в формате IgG1 оказался сравнительно менее стабильным после дезамидирования.

Проводили исследования стабильности, в ходе которых оба клон помещали на хранение либо в ФСБ; или в 10 мМ гистидине, pH 6,5, 10% трегалозе, 0,02% полисорбате 80; или в 25 мМ цитрате, pH 5,5, 150 мМ аргинине, 0,02% полисорбате 80. Антитела хранили при -20, 25 или 45°C. Стабильность оценивали с использованием обнаружения в УФ диапазоне и видимой части спектра, ЭХ-ВЭЖХ, ДСН-КЭ и КЭ-КЗЭ через 0, 2, 4 и 12 недель. Оба антитела продемонстрировали стабильность на аналогичных уровнях, с незначительным усилением разложения при 45°C.

YU100-G08_02A (IgG1) и YU100-G08_02A (IgG4) тестировали в клеточных анализах in vitro. Первичные звездчатые клетки печени активировали либо ТФР- β 1 (5 нг/мл), либо ИЛ-11 (2 нг/мл), либо ги-

пер-ИЛ-11 (200 пг/мл) и инкубировали с одним из антител в варьирующих концентрациях для определения значений IC50, как описано ранее. Нейтрализацию фиброзного ответа *in vitro* оценивали путем мониторинга секреции MMP2 в супернатант.

На фиг. 55A-55C показано, что YU100-G08_02A в обоих форматах блокировал (A) передачу сигналов эндогенного ИЛ-11, (B) передачу сигналов эндогенного ИЛ-11 и (C) транс-передачу сигналов ИЛ-11. Ингибирование продуцирования фиброгенных белков происходило во всех случаях.

Эффективность обоих антител *in vivo* тестировали в доклинической модели индуцированного HFMCSD НАСГ согласно описанию в примере 14. Животных кормили HFMCSD или обычным кормом в течение 4 недель. На протяжении последних 3 недель на рационе животные также получали лечение YU100-G08_02A IgG1 или IgG4 в варьирующих концентрациях. Уровни АЛТ в сыворотке и содержание коллагена в печени (анализ на НРА) оценивали через 4 недели содержания на рационе и лечения антителами. Для облегчения интерпретации данных на графики для всех антител наносили идентичные базовые значения и значения для получавших контрольный IgG животных.

Результаты представлены на фиг. 56A и 56B. Антитела обоих форматов были способны снижать уровни АЛТ в сыворотке (A) и содержание коллагена в печени (B), что указывает на обращение повреждения печени и фиброза. YU100-G08_02A IgG4 продемонстрировал несколько более высокую эффективность, чем вариант IgG1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная антигенсвязывающая молекула, способная к связыванию с ИЛ-11, причем указанная антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) варибельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 37;

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38;

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 40 и

(ii) варибельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 42;

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 45;

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 81.

2. Антигенсвязывающая молекула по п.1, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) варибельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 37;

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 38;

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 40 и

(ii) варибельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 42;

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 45;

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 57.

3. Антигенсвязывающая молекула по п.1 или 2, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 8; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 83.

4. Антигенсвязывающая молекула по п.3, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 8; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 20.

5. Выделенная антигенсвязывающая молекула, способная к связыванию с ИЛ-11, причем указанная антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) варибельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит следующие CDR:

HC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 95;

HC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 96 или вариант SEQ ID NO: 96, содержащий одну аминокислотную замену;

HC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 97 и

(ii) варибельную область легкой цепи (VL), которая содержит следующие CDR:

LC-CDR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 101;

LC-CDR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 102 или вариант SEQ ID NO: 102;

содержащий одну аминокислотную замену;

LC-CDR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 103.

6. Антигенсвязывающая молекула по п.5, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 117; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 122.

7. Антигенсвязывающая молекула по п.5, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит

область VH, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 117; и

область VL, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 122.

8. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.5-7, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит

область VH, содержащую следующие каркасные области (FR):

HC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 130;

HC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 133;

HC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 137 и

HC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 140.

9. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.5-8, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит

область VL, содержащую следующие каркасные области (FR):

LC-FR1 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 141;

LC-FR2 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 145;

LC-FR3 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 147 и

LC-FR4 с последовательностью аминокислот из SEQ ID NO: 149.

10. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.5-9, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит константную последовательность тяжелой цепи, содержащую область CH1, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 86, шарнирную область CH1-CH2, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 87, область CH2, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 88, и область CH3, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 89.

11. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.5-10, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула содержит константную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности аминокислот из SEQ ID NO: 90.

12. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-11, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать передачу сигналов, опосредованную ИЛ-11.

13. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-12, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит антигенсвязывающий домен, способный к связыванию с антигеном, который не является ИЛ-11.

14. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-13, отличающаяся тем, что указанная антигенсвязывающая молекула способна ингибировать взаимодействие между ИЛ-11 или комплексом, содержащим ИЛ-11, и рецептором ИЛ-11.

15. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-14.

16. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-14 или CAR по п.15.

17. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.16.

18. Клетка-хозяин, содержащая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-14, CAR по п.15, нуклеиновую кислоту по п.16 или экспрессионный вектор по п.17.

19. Способ экспрессии антигенсвязывающей молекулы или химерного антигенного рецептора (CAR), включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту по п.16, или экспрессионный вектор по п.17, в условиях, подходящих для экспрессии антигенсвязывающей молекулы или CAR с указанной нуклеиновой кислотой или экспрессионного вектора.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-14, CAR по п.15, нуклеиновую кислоту по п.16 или экспрессионный вектор по п.17.

21. Применение антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-14, CAR по п.15, нуклеиновой кислоты по п.16, экспрессионного вектора по п.17 или композиции по п.20 для лечения или предотвращения заболеваний, ассоциированных с опосредованной ИЛ-11 передачей сигналов.

22. Применение антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-14, CAR по п.15, нуклеиновой кислоты по п.16, экспрессионного вектора по п.17 или композиции по п.20 для лечения или предотвращения заболевания, ассоциированного с опосредованной ИЛ-11 передачей сигналов, где указанное заболевание представляет собой фиброз, заболевание, характеризующееся фиброзом, рак, воспаление, заболевание, характеризующееся воспалением, гепатотоксичность, заболевание, характеризующееся гепатотоксичностью, метаболическое заболевание, истощающее расстройство, повреждение почек или нефротоксичность.

23. Способ ингибирования опосредованной ИЛ-11 передачи сигналов, включающий приведение экспрессирующих ИЛ-11 клеток в контакт с антигенсвязывающей молекулой по любому из пп.1-14.

24. Полипептидный комплекс *in vitro*, содержащий: (i) антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-14, связанную с (ii) ИЛ-11.

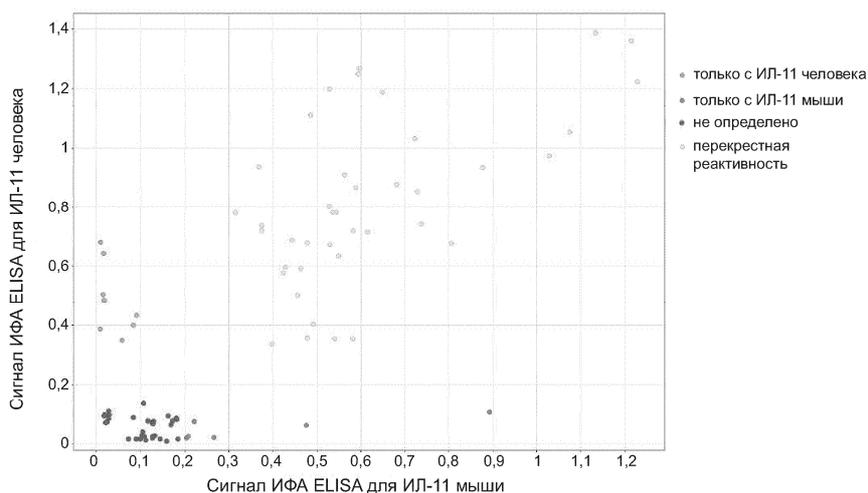
25. Способ обнаружения ИЛ-11 в образце, включающий приведение образца, содержащего или предположительно содержащего ИЛ-11 или полипептидный комплекс, содержащий ИЛ-11, в контакт с антигенсвязывающей молекулой по любому из пп.1-14, и обнаружение образования комплекса антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или полипептидным комплексом, содержащим ИЛ-11.

26. Способ выбора субъекта для лечения заболевания, ассоциированного с опосредованной ИЛ-11 передачей сигналов, направленным на ИЛ-11 агентом, который включает приведение *in vitro* образца от указанного субъекта в контакт с антигенсвязывающей молекулой по любому из пп.1-14 и обнаружение образования полипептидного комплекса антигенсвязывающей молекулы с ИЛ-11 или полипептидным комплексом, содержащим ИЛ-11.

27. Набор для лечения или профилактики заболеваний, ассоциированных с опосредованной ИЛ-11 передачей сигналов, содержащий заранее заданное количество антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-14, CAR по п.15, нуклеиновой кислоты по п.16, экспрессионного вектора по п.17 или композиции по п.20.

Стратегия №	Раунд 1	Раунд 2	Раунд 3	Биотинилир-е	Число первых совпадений
1	h-IL11	m-IL11	h-IL11	Да	1
2	h-IL11	h-IL11	h-IL11	Да	-
3	h-IL11	h-IL11	m-IL11	Да	-
4	m-IL11	m-IL11	m-IL11	Да	5
5	m-IL11	h-IL11	m-IL11	Да	-
6	m-IL11	h-IL11	h-IL11	Да	-
7	h-IL11	h-IL11	h-IL11	Нет	11
8	h-IL11	m-IL11	h-IL11	Нет	14
9	h-IL11	m-IL11	h-IL11	Раунд 2	17
10	h-IL11	h-IL11	m-IL11	Нет	19
11	h-IL11	h-IL11	m-IL11	Раунд 3	5
12	m-IL11	h-IL11	m-IL11	Раунд 3	10
13	m-IL11	m-IL11	h-IL11	Раунд 1, 2	6
14	m-IL11	m-IL11	m-IL11	Нет	36
15	m-IL11	h-IL11	m-IL11	Нет	15
16	m-IL11	m-IL11	h-IL11	Нет	36

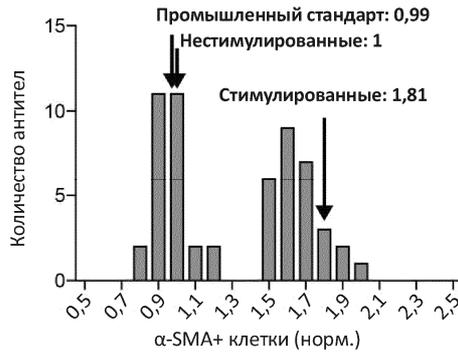
Фиг. 1



Фиг. 2

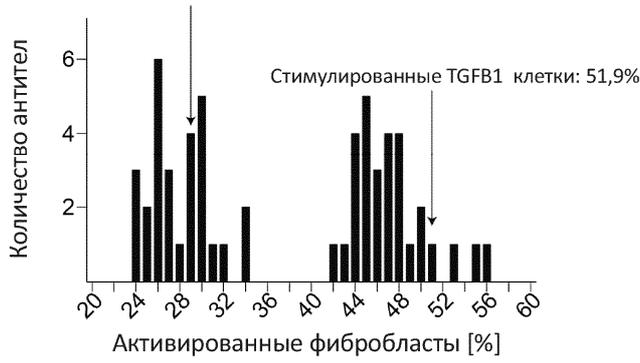
Идентичная послед-ть	ID клона	Fc-часть	Идентичная послед-ть	ID клона	Fc-часть
1	YU33-A2	hlgG1-Fc (IgG)	20	YU45-H8	hlgG1-Fc
2	YU33-B3	hlgG1-Fc (IgG)	21	YU45-F9	hlgG1-Fc
	YU33-H3	hlgG1-Fc (IgG)	22	YU45-H10	hlgG1-Fc
3	YU33-B4	hlgG1-Fc (IgG)	23	YU46-A10	hlgG1-Fc
	YU45-G2	hlgG1-Fc	24	YU45-F2	hlgG1-Fc
	YU45-A3	hlgG1-Fc	25	YU45-H3	hlgG1-Fc
4	YU33-E3	hlgG1-Fc (IgG)	26	YU45-A1	hlgG1-Fc
5	YU33-E6	hlgG1-Fc (IgG)	27	YU45-A8	hlgG1-Fc
6	YU45-C11	hlgG1-Fc		YU45-C6	hlgG1-Fc
	YU45-A10	hlgG1-Fc	28	YU45-B5	hlgG1-Fc
7	YU45-D11	hlgG1-Fc		YU45-A4	hlgG1-Fc
	YU45-F11	hlgG1-Fc	29	YU45-C3	hlgG1-Fc
8	YU45-E11	hlgG1-Fc		YU45-A6	hlgG1-Fc
	YU45-E12	hlgG1-Fc	30	YU45-D1	hlgG1-Fc
9	YU45-H11	hlgG1-Fc	31	YU45-D9	hlgG1-Fc
	YU45-D12	hlgG1-Fc		YU45-D3	hlgG1-Fc
10	YU45-A12	hlgG1-Fc	32	YU45-E5	hlgG1-Fc
	YU45-G10	hlgG1-Fc	33	YU45-G7	hlgG1-Fc
11	YU45-G1	hlgG1-Fc	34	YU45-B4	hlgG1-Fc
12	YU45-B2	hlgG1-Fc	35	YU45-H4	hlgG1-Fc
13	YU45-C2	hlgG1-Fc	36	YU45-B6	hlgG1-Fc
	YU45-A7	hlgG1-Fc	37	YU45-D6	hlgG1-Fc
	YU45-B10	hlgG1-Fc	38	YU45-E7	hlgG1-Fc
14	YU45-D2	hlgG1-Fc	39	YU45-F5	hlgG1-Fc
	YU45-H2	hlgG1-Fc	40	YU45-H7	hlgG1-Fc
	YU45-C7	hlgG1-Fc		YU46-B5	hlgG1-Fc
	YU45-F3	hlgG1-Fc	41	YU45-B8	hlgG1-Fc
	YU45-C9	hlgG1-Fc	42	YU45-C1	hlgG1-Fc
	YU45-E1	hlgG1-Fc	43	YU46-G1	hlgG1-Fc
	YU45-E9	hlgG1-Fc	44	YU46-A2	hlgG1-Fc
	YU45-C10	hlgG1-Fc	45	YU46-A8	hlgG1-Fc
	YU45-G3	hlgG1-Fc	46	YU46-B2	hlgG1-Fc
	YU45-H9	hlgG1-Fc	47	YU46-B6	hlgG1-Fc
	YU45-C5	hlgG1-Fc	48	YU46-C1	hlgG1-Fc
	YU45-A2	hlgG1-Fc	49	YU46-D7	hlgG1-Fc
YU45-A5	hlgG1-Fc	50	YU46-E3	hlgG1-Fc	
15	YU45-B3	hlgG1-Fc	51	YU46-E7	hlgG1-Fc
16	YU45-E3	hlgG1-Fc	52	YU46-H8	hlgG1-Fc
17	YU45-C8	hlgG1-Fc	53	YU46-G9	hlgG1-Fc
	YU45-E8	hlgG1-Fc	54	YU46-G8	hlgG1-Fc
18	YU45-F8	hlgG1-Fc	55	YU46-B7	hlgG1-Fc
19	YU45-G8	hlgG1-Fc	56	YU46-D3	hlgG1-Fc
	YU45-H6	hlgG1-Fc			

Фиг. 3



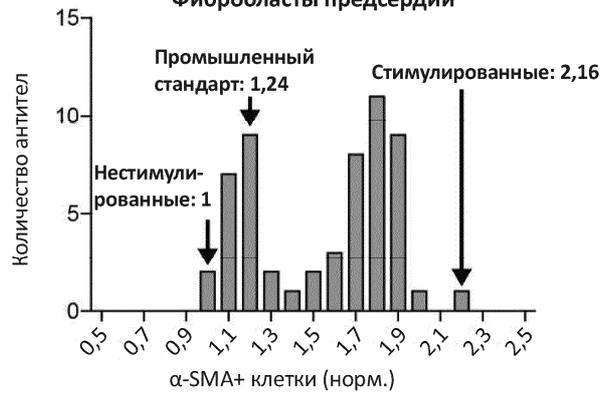
Фиг. 4А

TGFB1 + коммерческое антитело: 28,3%
 Нестимулированные клетки: 28,6%



Фиг. 4В

Фибробласты предсердий

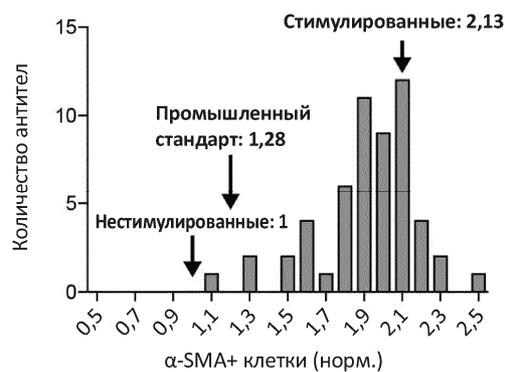


Фиг. 5А

Фибробласты кожи



Фиг. 5В

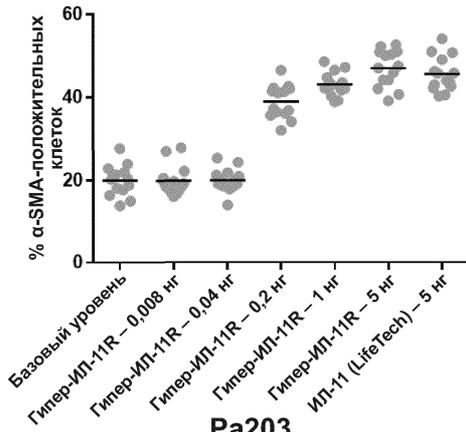


Фиг. 6

Кандидатное АТ	ИП-11 человека	ИП-11 мыши	Транс-ИП-11	ИП-11 мыши
	Активир. фибробласты (норм.)	Активир. фибробласты предсердий (норм.)	Активир. фибробласты (норм.)	Активир. фибробласты кожи (норм.)
-	1,81	2,16	2,13	1,95
Промышл. стандарт	0,99	1,24	1,28	1,28
1	1,91	1,75	2,16	1,98
2	1,95	1,83	2,09	1,91
3	1,11	1,08	1,14	1,59
4	1,85	1,85	2,13	1,83
5	1,78	1,72	2,13	1,62
6	0,91	1,25	2,26	1,40
7	1,03	1,79	2,18	1,93
8	1,01	1,83	2,05	1,85
9	1,17	1,22	1,71	1,54
10	1,67	1,75	1,28	1,86
11	0,94	1,03	2,61	1,49
12	0,99	1,83	1,83	1,94
13	1,76	1,91	1,86	2,09
14	1,04	1,11	2,04	1,46
15	1,57	1,13	1,90	1,39
16	0,88	1,69	1,58	1,76
17	1,55	1,70	1,46	1,76
18	0,82	1,08	1,85	1,40
19	1,01	1,26	1,77	1,53
20	1,65	1,78	1,47	1,78
21	0,89	1,83	2,06	1,83
22	0,92	1,17	2,02	1,56
23	1,69	1,11	2,27	1,72
24	0,96	1,87	1,29	1,89
25	0,94	1,24	2,04	1,43
26	1,68	1,92	2,50	1,94
27	1,05	1,05	2,15	1,44
28	1,09	2,19	2,12	1,79
29	1,65	1,37	2,10	1,61
30	1,63	1,89	1,89	1,88
31	1,04	1,23	1,76	1,28
32	1,68	2,03	2,00	1,89
33	0,95	1,56	1,94	1,79
34	1,59	1,88	1,94	1,83
35	1,76	1,86	2,06	1,73
36	0,84	1,17	1,99	1,20
37	1,61	1,92	1,82	1,75
38	1,54	1,91	1,98	1,81
39	1,02	1,47	1,63	1,82
40	1,18	1,78	1,97	1,85
41	1,57	1,78	1,87	1,69
42	0,85	1,21	2,04	1,19
43	1,54	1,78	2,06	1,72
44	1,57	1,71	2,13	1,61
45	1,03	1,18	1,60	1,79
46	1,67	1,72	2,11	1,77
47	0,89	1,81	1,90	1,76
48	1,50	1,21	1,84	1,41
49	1,60	1,70	1,89	1,70
50	0,86	1,81	1,83	1,82
51	1,55	1,46	2,09	1,66
52	1,62	1,06	2,09	1,23
53	1,47	1,57	1,90	1,68
54	0,90	1,23	1,57	1,82
55	1,56	1,61	2,16	1,80
56	0,91	1,13	1,87	1,47

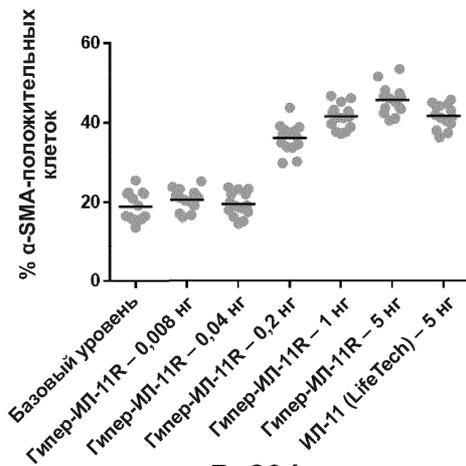
Фиг. 7

048010



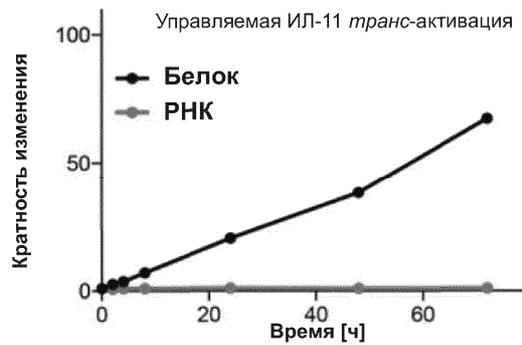
Pa203

Фиг. 8А

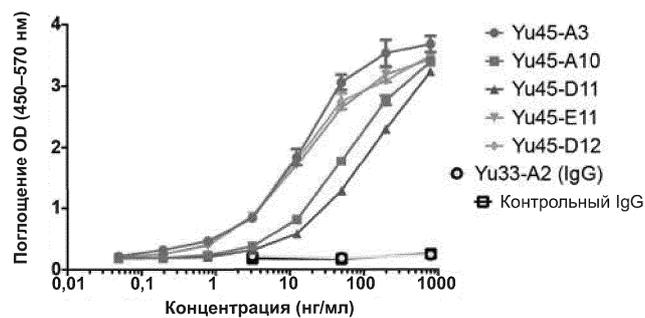


Pa204

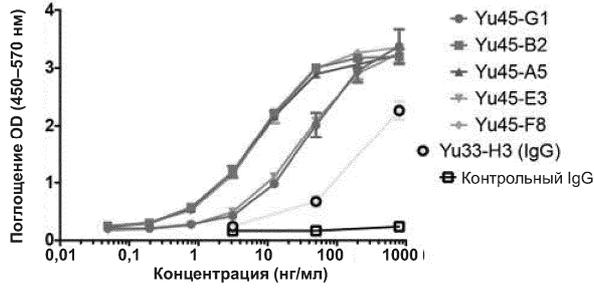
Фиг. 8В



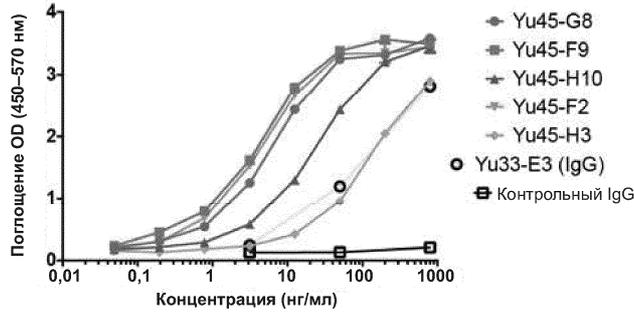
Фиг. 9



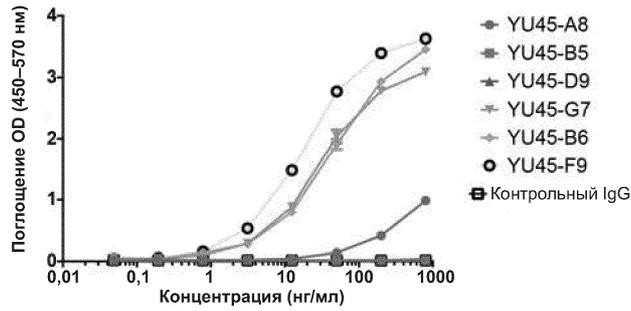
Фиг. 10А



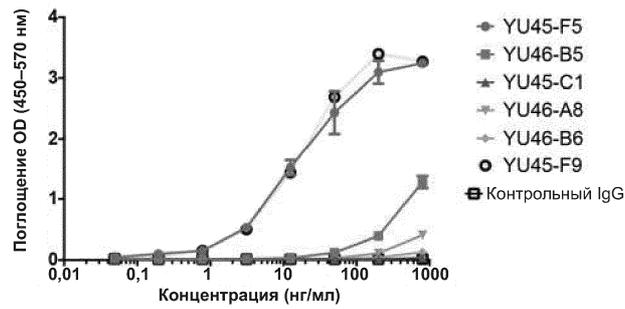
Фиг. 10В



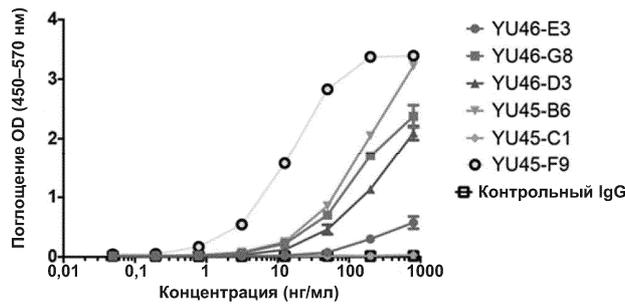
Фиг. 10С



Фиг. 10D



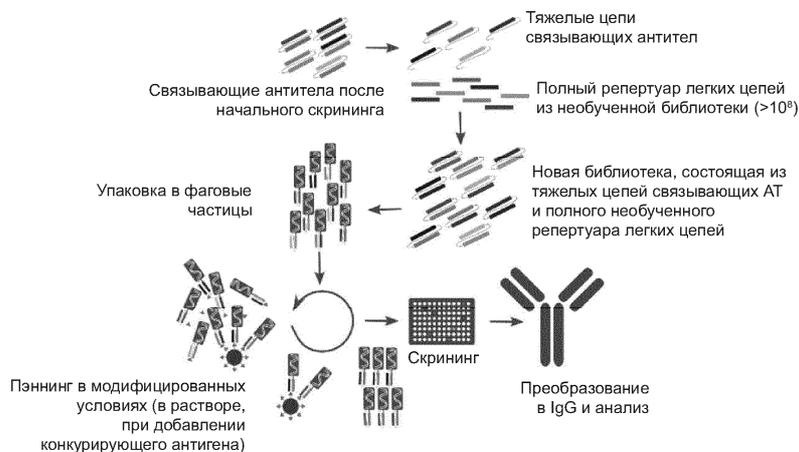
Фиг. 10E



Фиг. 10F

Группа последовательностей	Клон	Формат	EC50
3	YU45-A3	hlgG-Fc	14,22
6	YU45-A10	hlgG-Fc	67,67
7	YU45-D11	hlgG-Fc	186,5
8	YU45-E11	hlgG-Fc	15,66
9	YU45-D12	hlgG-Fc	14,55
11	YU45-G1	hlgG-Fc	42,75
12	YU45-B2	hlgG-Fc	6,409
14	YU45-A5	hlgG-Fc	6,543
16	YU45-E3	hlgG-Fc	33,19
18	YU45-F8	hlgG-Fc	7,786
19	YU45-G8	hlgG-Fc	6,288
21	YU45-F9	hlgG-Fc	4,016
22	YU45-H10	hlgG-Fc	24,8
24	YU45-F2	hlgG-Fc	4,239
25	YU45-H3	hlgG-Fc	126,1
27	YU45-A8	hlgG-Fc	710
31	YU45-D9	hlgG-Fc	709,8
33	YU45-G7	hlgG-Fc	10,15
36	YU45-B6	hlgG-Fc	4984
39	YU45-F5	hlgG-Fc	10,07
40	YU46-B5	hlgG-Fc	234,1
42	YU45-C1	hlgG-Fc	217
45	YU46-A8	hlgG-Fc	351,2
47	YU46-B6	hlgG-Fc	222,3
50	YU46-E3	hlgG-Fc	706,7
54	YU46-G8	hlgG-Fc	32,27
56	YU46-D3	hlgG-Fc	654,8
3	Yu33-B4	hlgG-Fc	197,6

Фиг. 11

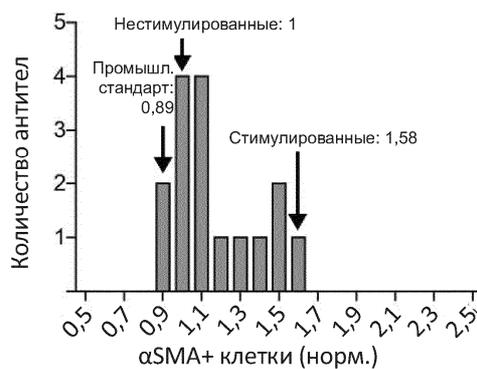


Фиг. 12

ID	Клон
A1	BSN-1H2
A2	BSN-1H7
A3	BSN-2E1
A4	BSN-2F5
A5	BSN-2G6
A6	BSN-3C6
A7	BSN-3C11
A8	BSN-5A6
A9	BSN-5B8
A10	BSN-5F6
A11	BSN-6F3
A12	BSN-7D4
A13	BSN-7E4
A14	BSN-7F9
A15	BSN-8C4
A16	BSN-8H11

Фиг. 13

Антитела мыши против ИЛ-11
на фибробластах предсердий человека



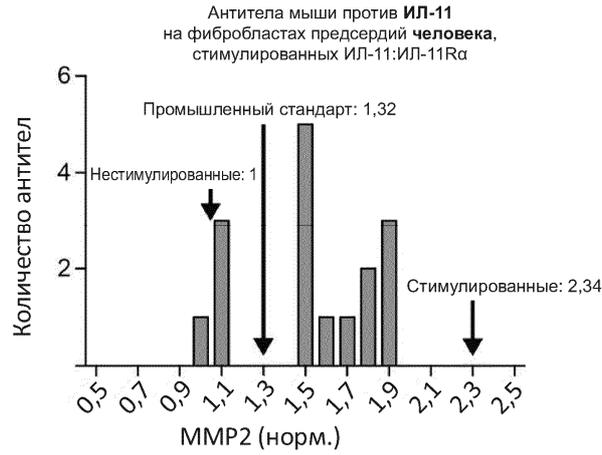
Фиг. 14

Антитела мыши против ИЛ-11
на фибробластах предсердий мыши



Фиг. 15

048010



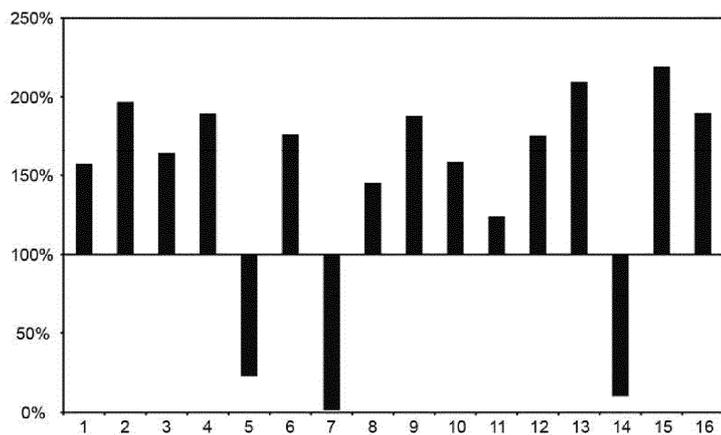
Фиг. 16

Кандидатное АТ	ИЛ-11 человека	ИЛ-11 мыши	Транс-ИЛ-11
	активир. фибробласты (норм.)	активир. фибробласты (норм.)	MMP2 (норм.)
Нестимулированные	1	1	1
Стимулированные	1,58	2,24	2,34
Промышл. стандарт	0,89	1,44	1,32
A1	1,11	1,63	1,45
A2	1,28	2,17	1,55
A3	1,16	1,30	1,57
A4	1,41	2,14	1,78
A5	0,98	1,28	1,11
A6	0,92	1,31	1,09
A7	0,88	2,24	1,51
A8	1,05	1,49	1,88
A9	1,00	1,91	1,05
A10	1,52	1,80	1,52
A11	1,09	1,99	1,91
A12	1,12	1,82	1,07
A13	1,63	1,99	1,53
A14	1,04	1,69	1,93
A15	1,53	1,64	1,79
A16	1,08	1,82	1,66

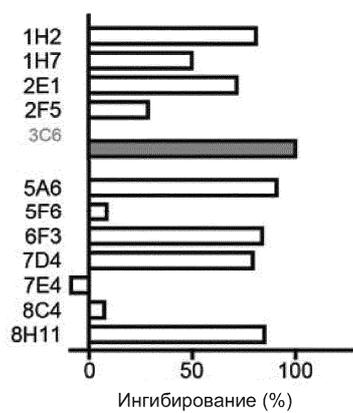
Фиг. 17

Супернатанты гибридом, инкубированные с клетками, трансфицированными pB1-L11-hum.FL				
протоочная цитометрия (Attunes)				
Результаты субклонирования				
№	Клон	GMFI	% от положит. контроля	изотип
1	BSN-1H2	197496	157%	IgG1/каппа
2	BSN-1H7	247434	197%	IgG2a+IgG2c/каппа
3	BSN-2E1	206192	164%	IgG1/каппа
4	BSN-2F5	238332	190%	IgG1/каппа
5	BSN-2G6	28568	23%	IgG2b/каппа
6	BSN-3C6	221636	176%	IgG1/каппа
7	BSN-3C11	1687	1%	н/о /каппа
8	BSN-5A6	182487	145%	IgG1/каппа
9	BSN-5B8	236341	188%	IgG1/каппа
10	BSN-5F6	199029	158%	IgG1/каппа
11	BSN-6F3	156008	124%	IgG2a+IgG2c/каппа
12	BSN-7D4	220736	176%	IgG2a+IgG2c/каппа
13	BSN-7E4	263377	209%	IgG1/каппа
14	BSN-7F9	12798	10%	IgG1/каппа
15	BSN-8C4	275552	219%	IgG1/каппа
16	BSN-8H11	238663	190%	IgG2b/каппа
положительный контроль		125733	100%	
отрицательный контроль		1028	1%	

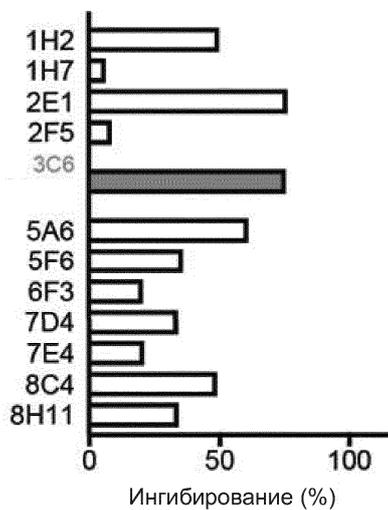
Фиг. 18А



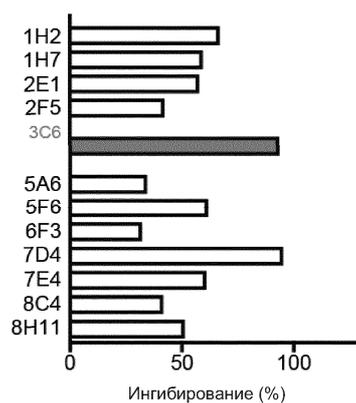
Фиг. 18В



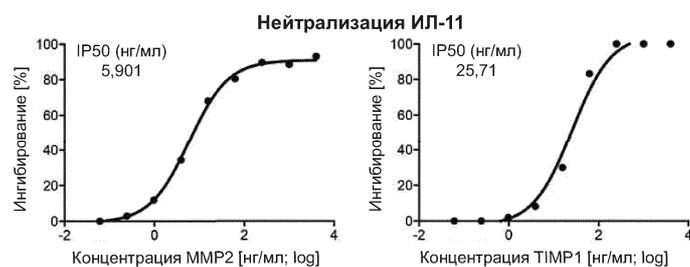
Фиг. 18С



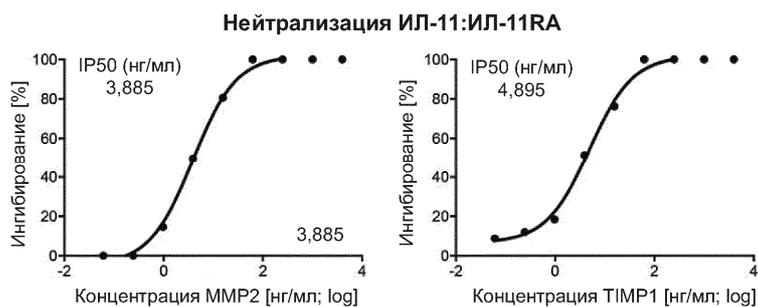
Фиг. 18D



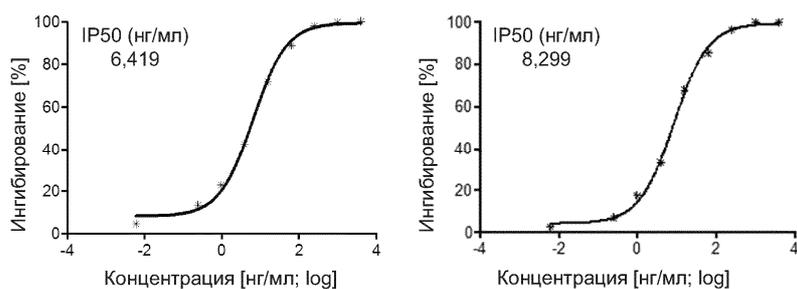
Фиг. 18E



Фиг. 18F



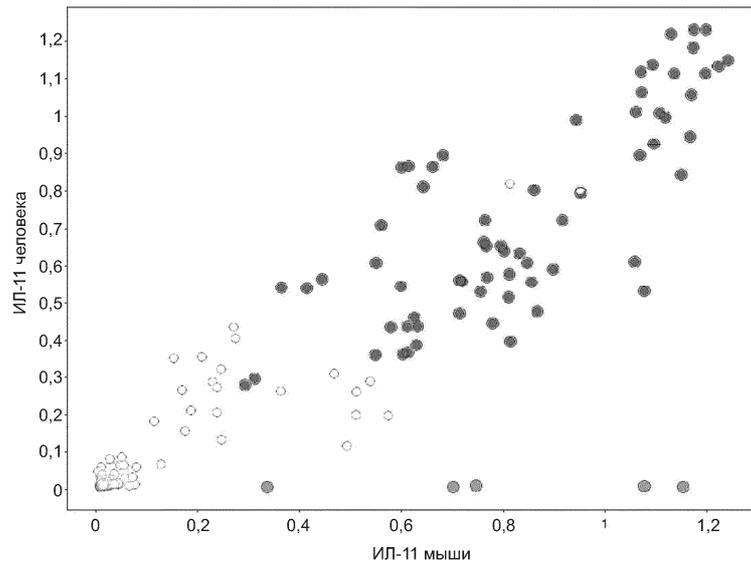
Фиг. 18G



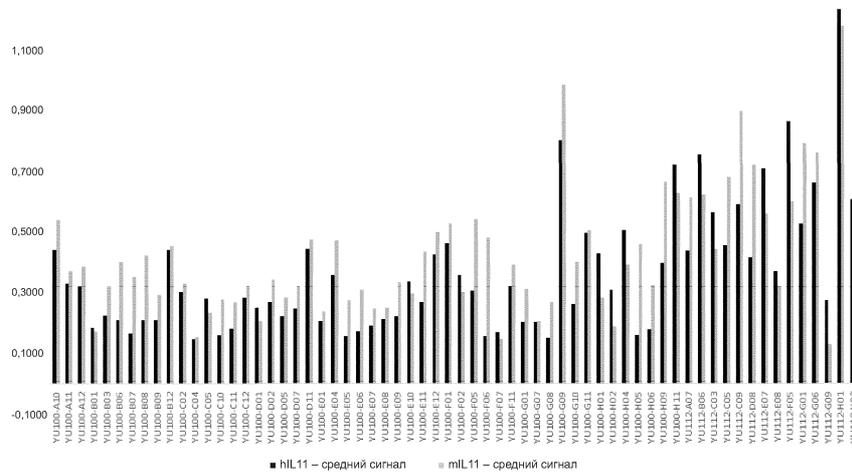
Фиг. 18H

№ стратегии	Раунд 1	Раунд 2	конкуренция в растворе с:	Число первых совпадений (подбиблиотека лямбда)	Число первых совпадений (подбиблиотека каппа)
1	h-IL11	h-IL11	h-IL11	27	14
2	m-IL11	m-IL11	m-IL11	103	36
3	h-IL11	m-IL11	h-IL11/m-IL11	11	21

Фиг. 19



Фиг. 20

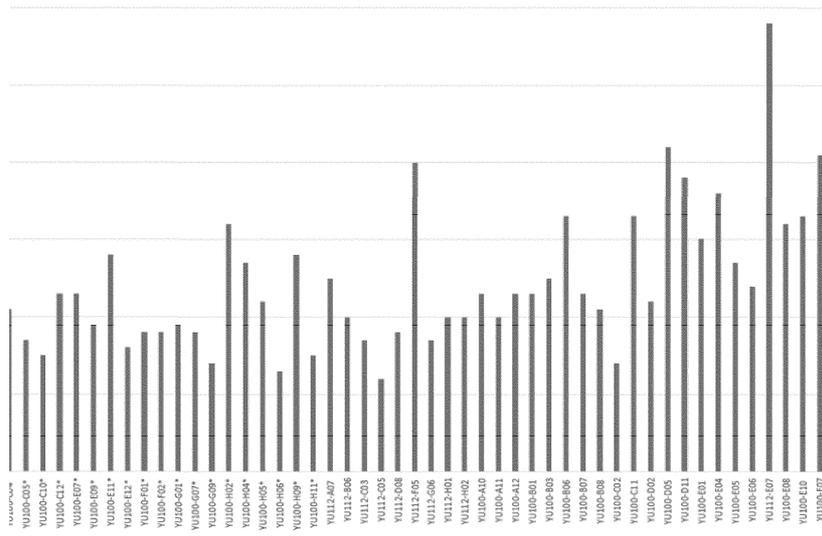


Фиг. 21А

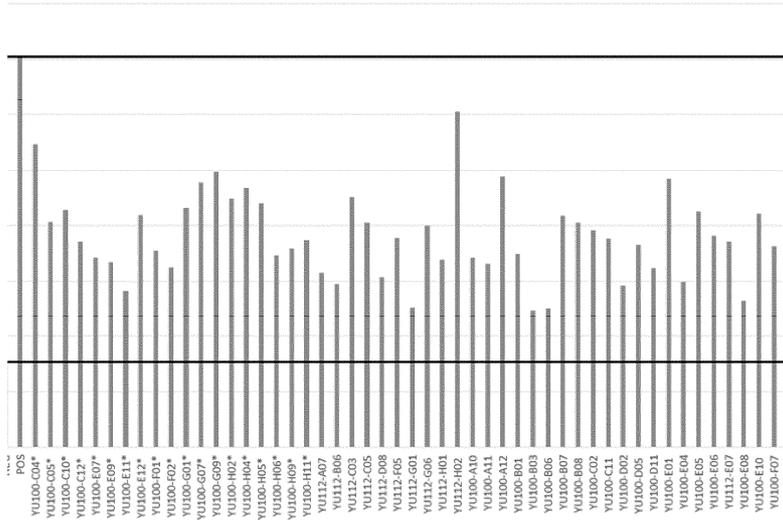
048010

Клон	hIL11 – средний сигнал	mIL11 – средний сигнал	Клон	hIL11 – средний сигнал	mIL11 – средний сигнал
YU100-A10	0,4430	0,5400	YU100-F07	0,1720	0,1480
YU100-A11	0,3328	0,3716	YU100-F11	0,3190	0,3950
YU100-A12	0,3200	0,3883	YU100-G01	0,2050	0,3100
YU100-B01	0,1870	0,1750	YU100-G07	0,2030	0,2060
YU100-B03	0,2270	0,3210	YU100-G08	0,1530	0,2700
YU100-B06	0,2090	0,4040	YU100-G09	0,8023	0,9846
YU100-B07	0,1670	0,3540	YU100-G10	0,2620	0,4040
YU100-B08	0,2090	0,4230	YU100-G11	0,4980	0,5070
YU100-B09	0,2100	0,2930	YU100-H01	0,4300	0,2830
YU100-B12	0,4430	0,4540	YU100-H02	0,3090	0,1880
YU100-C02	0,3010	0,3330	YU100-H04	0,5080	0,3930
YU100-C04	0,1480	0,1550	YU100-H05	0,1630	0,4610
YU100-C05	0,2810	0,2350	YU100-H06	0,1810	0,3280
YU100-C10	0,1610	0,2770	YU100-H09	0,4000	0,6680
YU100-C11	0,1830	0,2670	YU100-H11	0,7240	0,6290
YU100-C12	0,2829	0,3226	YU112-A07	0,4380	0,6120
YU100-D01	0,2510	0,2060	YU112-B06	0,7563	0,6217
YU100-D02	0,2680	0,3460	YU112-C03	0,5660	0,4450
YU100-D05	0,2230	0,2840	YU112-C05	0,4576	0,6850
YU100-D07	0,2460	0,3220	YU112-C09	0,5930	0,8980
YU100-D11	0,4470	0,4750	YU112-D08	0,4180	0,7230
YU100-E01	0,2070	0,2380	YU112-E07	0,7100	0,5610
YU100-E04	0,3600	0,4720	YU112-E08	0,3733	0,3233
YU100-E05	0,1600	0,2750	YU112-F05	0,8630	0,6010
YU100-E06	0,1730	0,3090	YU112-G01	0,5280	0,7937
YU100-E07	0,1930	0,2470	YU112-G06	0,6640	0,7620
YU100-E08	0,2140	0,2510	YU112-G09	0,2760	0,1310
YU100-E09	0,2240	0,3350	YU112-H01	1,2290	1,1750
YU100-E10	0,3380	0,2970	YU112-H02	0,6060	0,7850
YU100-E11	0,2675	0,4350			
YU100-E12	0,4260	0,5000			
YU100-F01	0,4640	0,5280			
YU100-F02	0,3610	0,3030			
YU100-F05	0,3040	0,5420			
YU100-F06	0,1600	0,4810			

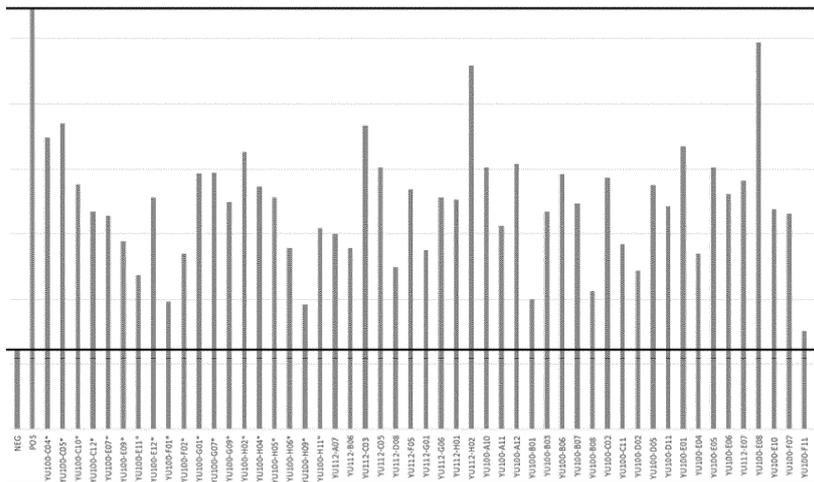
Фиг. 21В



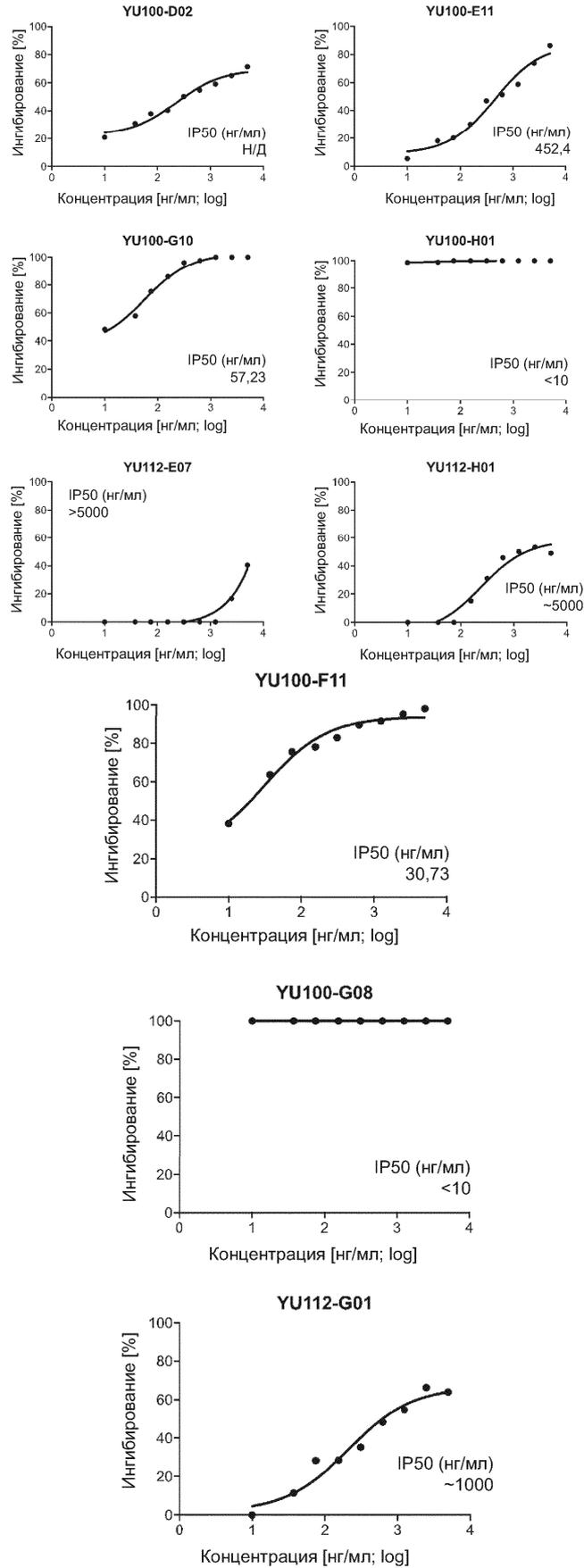
Фиг. 22



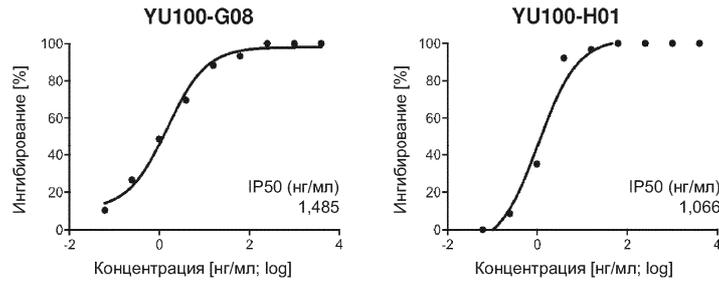
Фиг. 23А



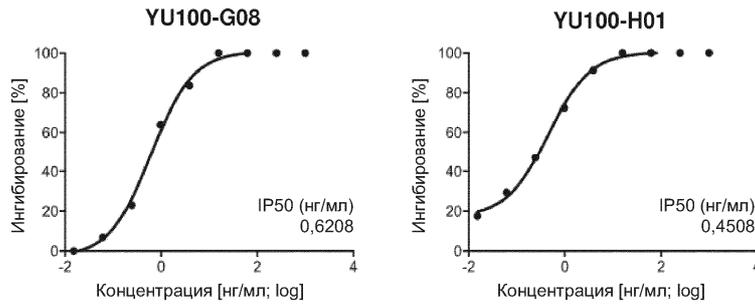
Фиг. 23В



Фиг. 23С



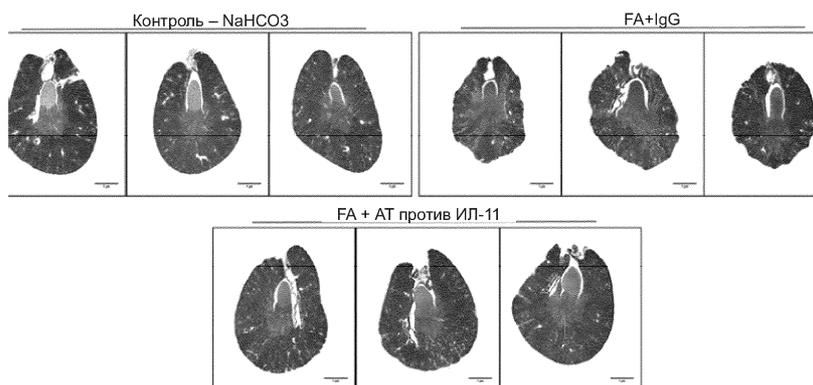
Фиг. 23D



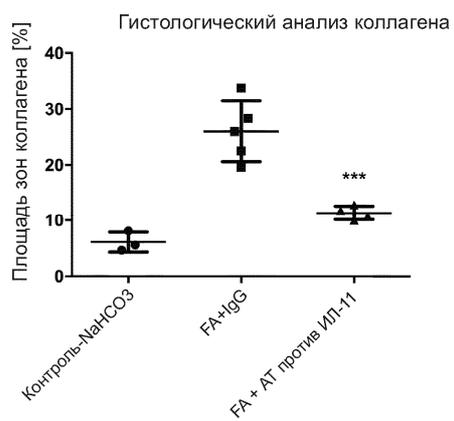
Фиг. 23E

	Аффинность EC50 (нг/мл)	Продукция MMP2 (нг/мл) (Эксперимент 1)	Продукция MMP2 (нг/мл) (Эксперимент 2)
Без ТФР-β1, контрольный IgG1 (отрицательный, NEG)	-	42,7	36,2
+ ТФР-β1, контрольный IgG1 (положительный, POS)	-	70,2	62,3
YU100-C04*	21	62,3	52,5
YU100-C05*	17	55,3	53,5
YU100-C10*	15	56,4	48,9
YU100-C12*	23	53,5	46,8
YU100-E07*	23	52,1	46,5
YU100-E09*	19	51,7	44,4
YU100-E11*	28	49,1	41,9
YU100-E12*	16	56,0	47,9
YU100-F01*	18	52,8	39,9
YU100-F02*	18	51,2	43,5
YU100-G01*	19	56,6	49,7
YU100-G07*	18	59,0	49,7
YU100-G09*	14	59,9	47,5
YU100-H02*	32	57,5	51,3
YU100-H04*	27	58,5	48,7
YU100-H05*	22	57,1	47,8
YU100-H06*	13	52,3	43,9
YU100-H09*	28	52,9	39,6
YU100-H11*	15	53,7	45,5
YU112-A07	25	50,7	45,0
YU112-B06	20	49,7	43,9
YU112-C03	17	57,6	53,3
YU112-C05	12	55,2	50,1
YU112-D08	18	50,3	42,5
YU112-F05	40	53,9	48,5
YU112-G01	N/O	47,6	43,8
YU112-G06	17	55,0	47,8
YU112-H01	20	51,9	47,7
YU112-H02	20	65,3	58,0
YU100-A10	23	52,1	50,1
YU100-A11	20	51,6	45,7
YU100-A12	23	59,5	50,4
YU100-B01	23	52,5	40,0
YU100-B03	25	47,3	46,8
YU100-B06	33	47,6	49,6
YU100-B07	23	55,9	47,4
YU100-B08	21	55,3	40,6
YU100-C02	14	54,6	49,4
YU100-C11	33	53,8	44,2
YU100-D02	22	49,6	42,2
YU100-D05	42	53,3	48,8
YU100-D11	38	51,2	47,2
YU100-E01	30	59,3	51,8
YU100-E04	36	50,0	43,5
YU100-E05	27	56,3	50,2
YU100-E06	24	54,1	48,2
YU112-E07	58	53,5	49,1
YU100-E08	32	48,2	59,7
YU100-E10	33	56,1	47,0
YU100-F07	41	53,1	46,6
YU100-F11	27	44,5	37,6
YU100-G08	28	42,3	38,0
YU100-G10	34	54,0	45,4
YU100-H01	53	48,3	42,2

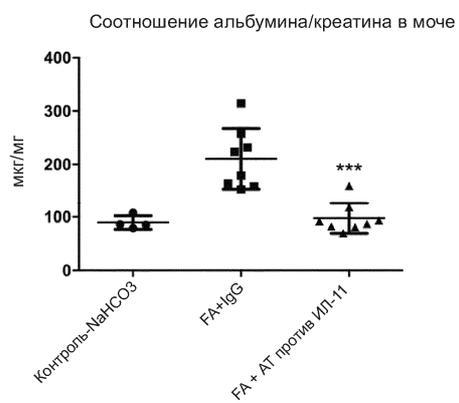
Фиг. 24



Фиг. 25А

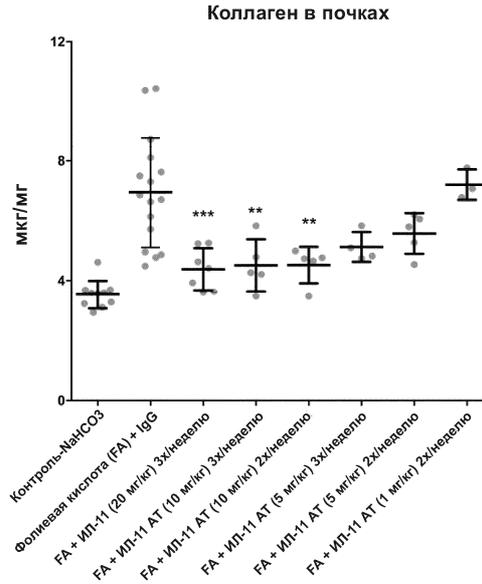


Фиг. 25В

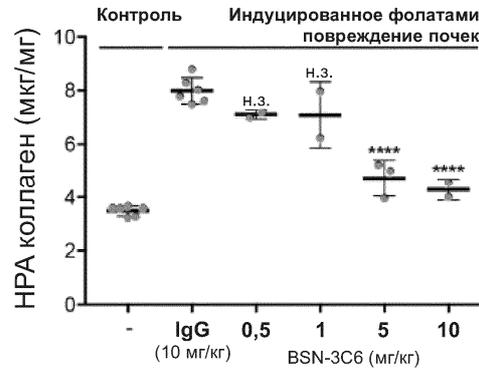


Фиг. 26

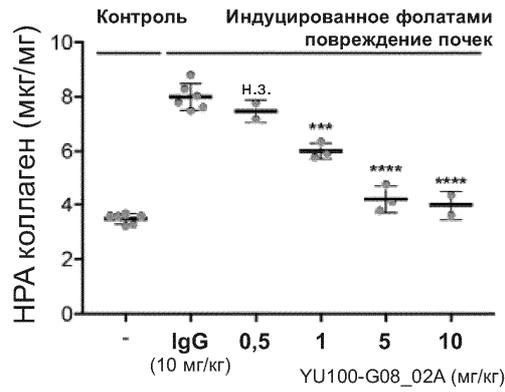
048010



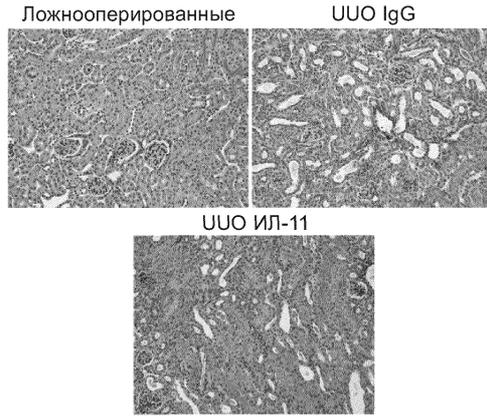
Фиг. 27А



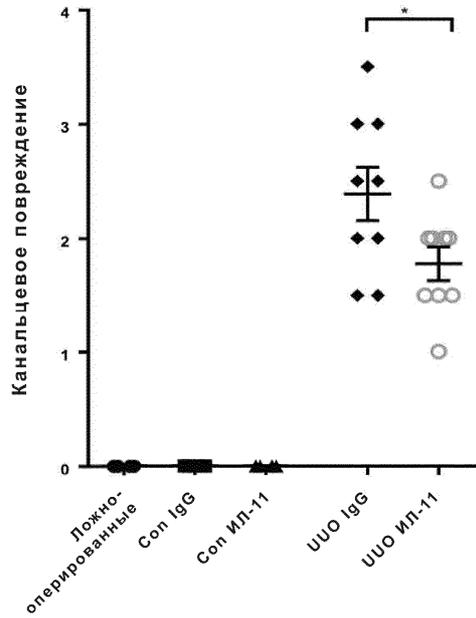
Фиг. 27В



Фиг. 27С



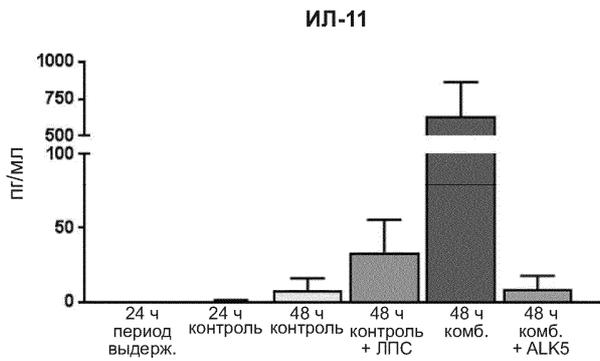
Фиг. 28А



Фиг. 28В

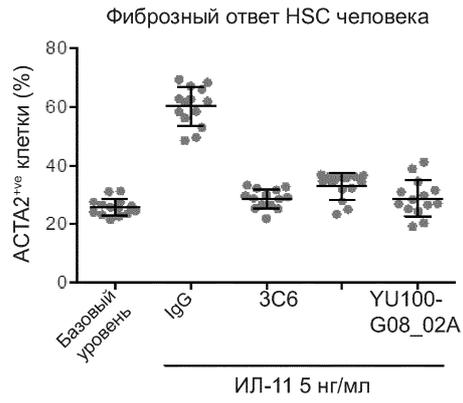


Фиг. 29

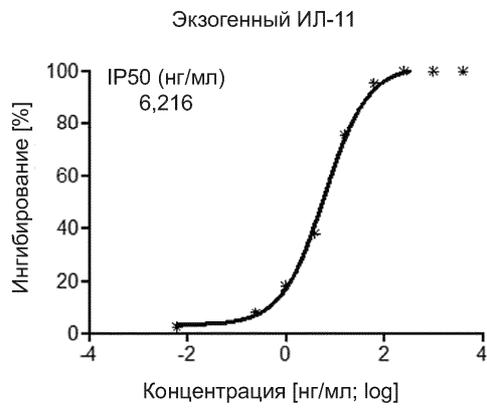
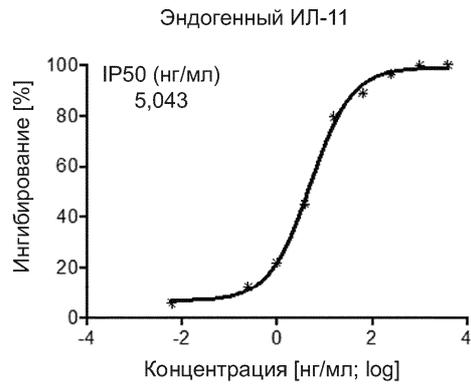


Фиг. 30А

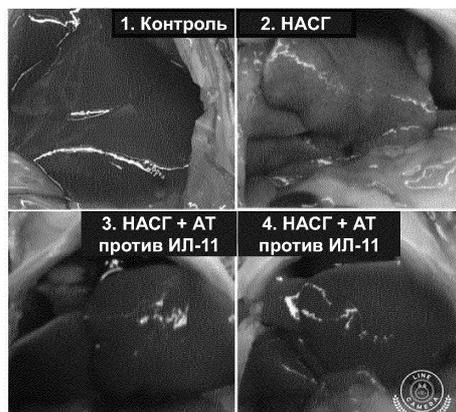
048010



Фиг. 30В

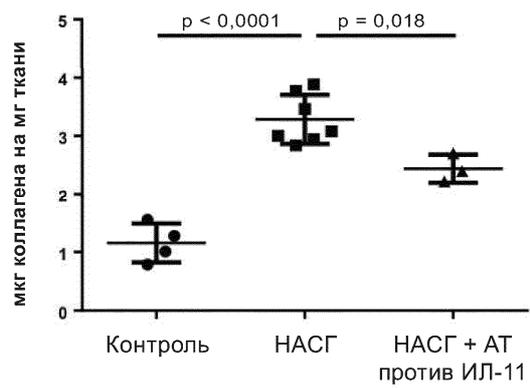


Фиг. 30С

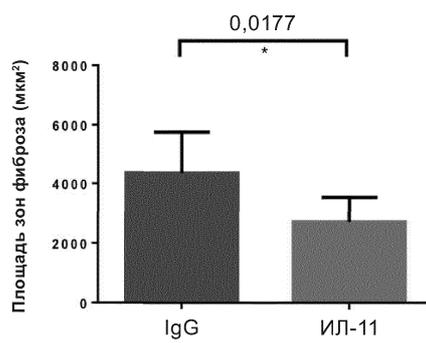


Фиг. 31А

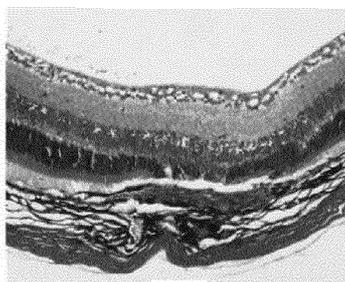
048010



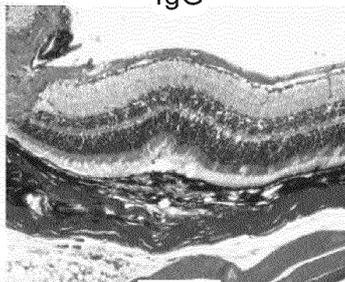
Фиг. 31В



Фиг. 32А

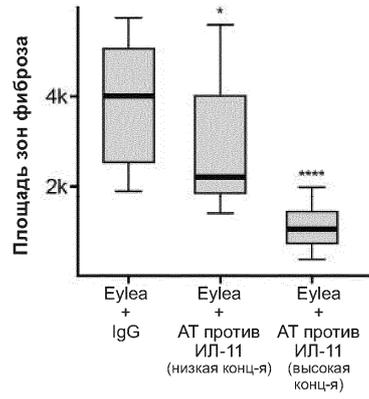


IgG

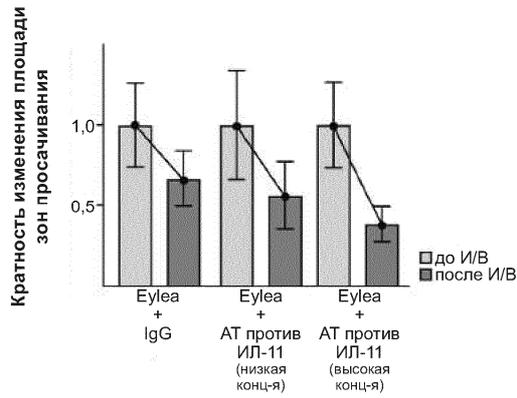


ИЛ-11
Фиг. 32В

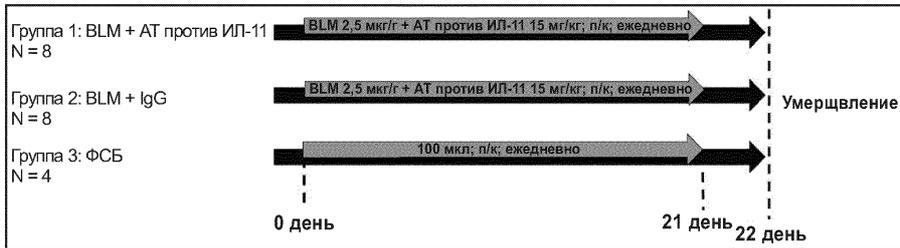
048010



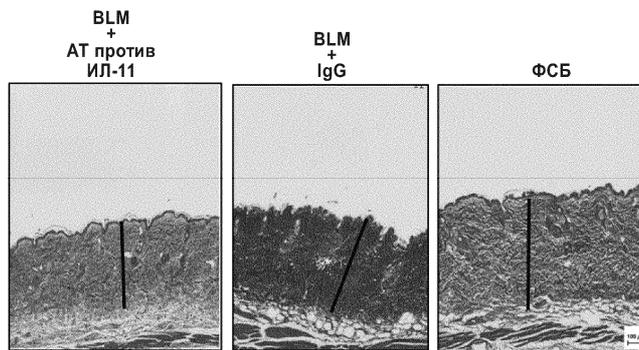
Фиг. 32С



Фиг. 32D

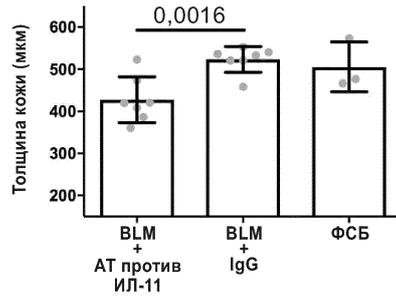


Фиг. 33А

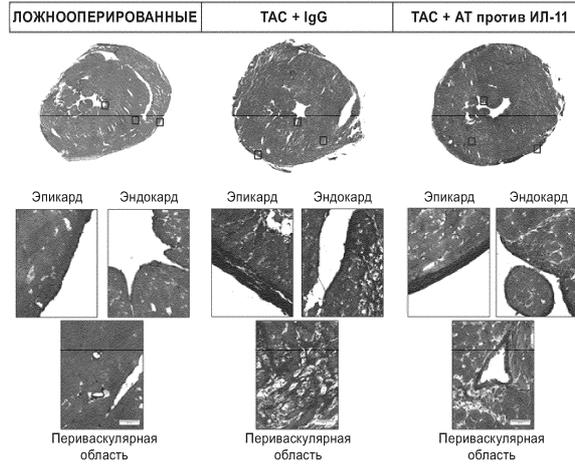


Фиг. 33В

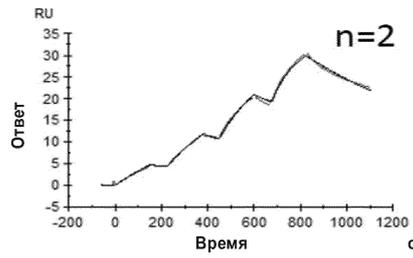
048010



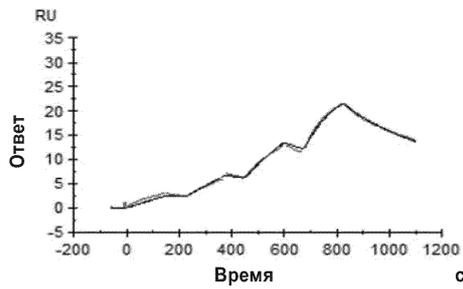
Фиг. 33С



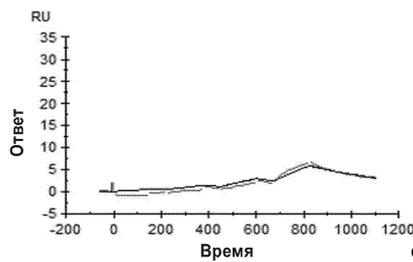
Фиг. 34



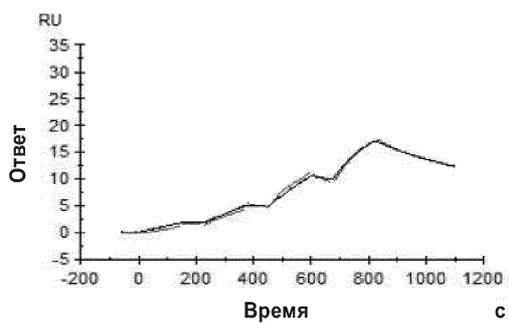
Фиг. 35А



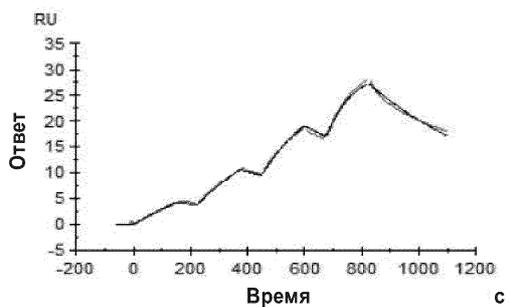
Фиг. 35В



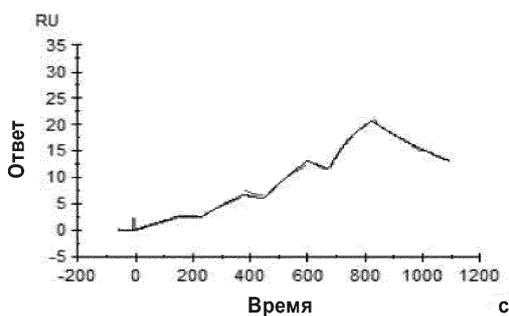
Фиг. 35С



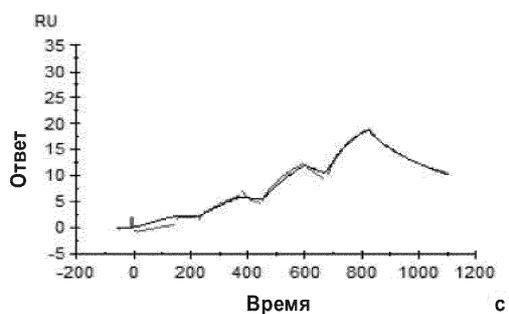
Фиг. 35D



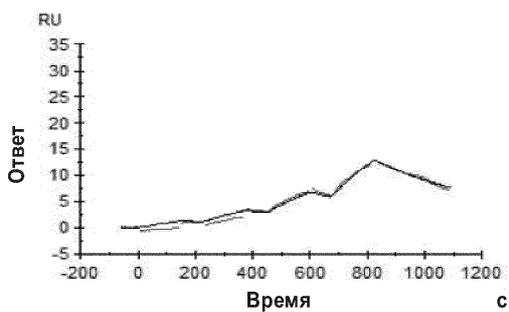
Фиг. 35E



Фиг. 35F

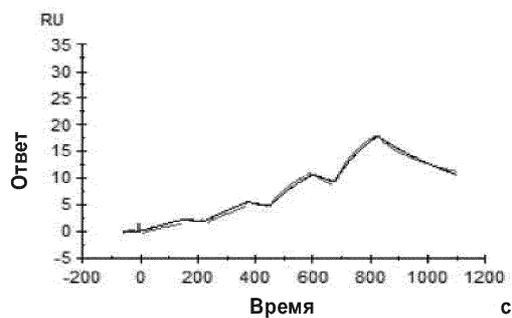


Фиг. 35G



Фиг. 35H

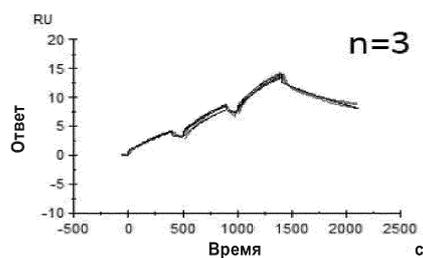
048010



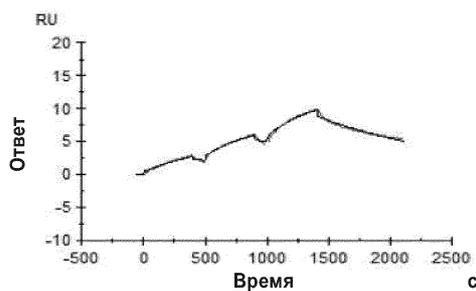
Фиг. 35I

	k_v (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	хи-квадрат (RU ²)	
C89	$3,69 \times 10^5$	$1,30 \times 10^{-3}$	$3,51 \times 10^{-9}$	0,172	1,00
C89A	$6,99 \text{E} \times 10^5$	$3,12 \times 10^{-3}$	$4,46 \times 10^{-9}$	0,133	1,27
C89G	$2,72 \times 10^4$	$5,37 \times 10^{-2}$	$1,98 \times 10^{-6}$	0,488	564,
G89I	$8,25 \times 10^5$	$2,38 \times 10^{-3}$	$2,89 \times 10^{-9}$	0,145	0,82
C89L	$4,63 \times 10^5$	$2,02 \times 10^{-3}$	$4,36 \times 10^{-9}$	0,159	1,24
C89Q	$4,26 \times 10^5$	$2,49 \times 10^{-3}$	$5,84 \times 10^{-9}$	0,0681	1,66
C89S	$1,28 \times 10^6$	$6,39 \times 10^{-3}$	$4,99 \times 10^{-9}$	0,35	1,42
C89T	$5,92 \times 10^4$	$2,07 \times 10^{-3}$	$3,50 \times 10^{-8}$	0,327	9,97
C89V	$2,07 \times 10^5$	$2,15 \times 10^{-3}$	$1,04 \times 10^{-8}$	0,204	2,96

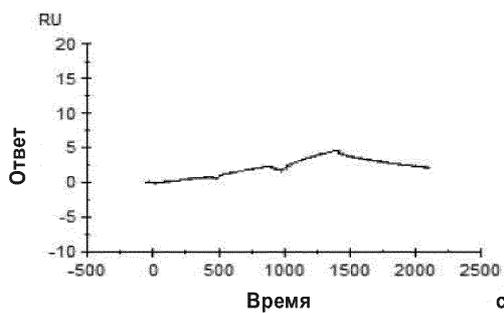
Фиг. 35J



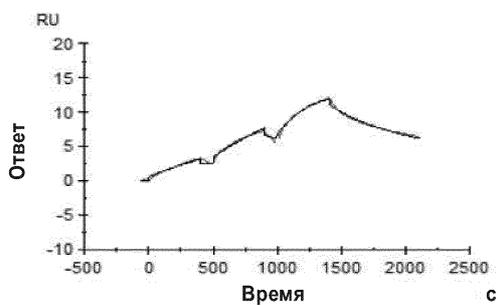
Фиг. 36А



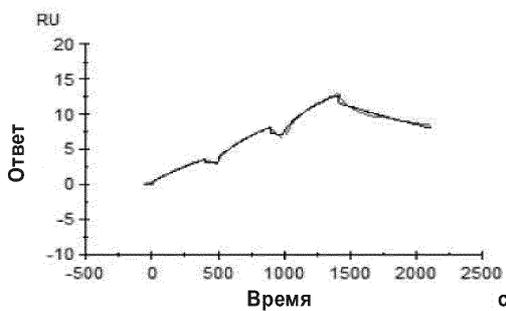
Фиг. 36В



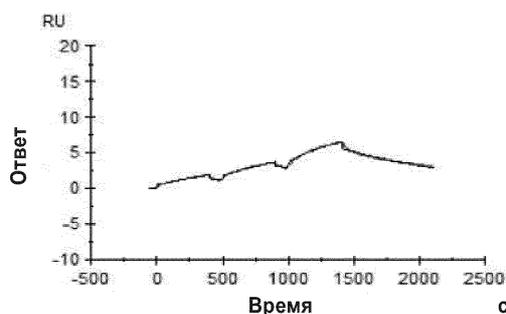
Фиг. 36С



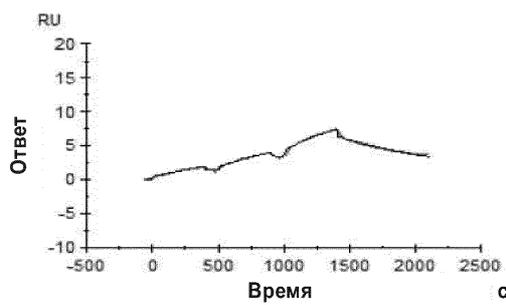
Фиг. 36D



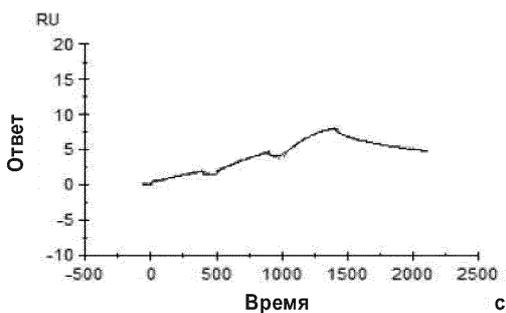
Фиг. 36E



Фиг. 36F

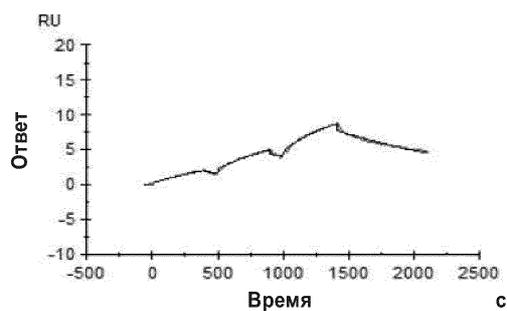


Фиг. 36G



Фиг. 36H

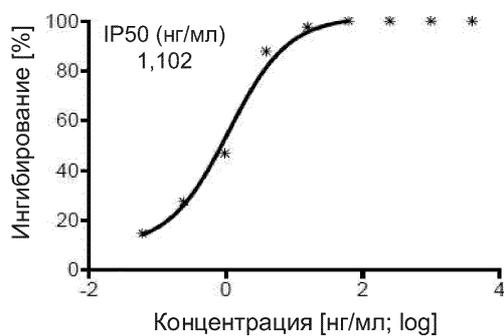
048010



Фиг. 36I

	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	хи-квадрат (RU ²)	
C89	$1,48 \times 10^4$	$6,58 \times 10^{-3}$	$4,23 \times 10^{-8}$	0,0768	1,00
C89A	$1,29 \text{E} \times 10^4$	$8,10 \times 10^{-4}$	$6,26 \times 10^{-8}$	0,038	1,48
C89G	$1,76 \times 10^3$	$9,86 \times 10^{-4}$	$5,60 \times 10^{-7}$	0,0135	13,2
G89I	$9,21 \times 10^4$	$2,69 \times 10^{-3}$	$2,92 \times 10^{-8}$	0,0428	0,69
C89L	$1,57 \times 10^4$	$5,26 \times 10^{-4}$	$3,35 \times 10^{-8}$	0,0532	0,79
C89Q	$9,29 \times 10^3$	$9,66 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-7}$	0,0171	2,4
C89S	$8,47 \times 10^3$	$9,05 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-7}$	0,0198	2,5
C89T	$7,42 \times 10^5$	$1,27 \times 10^{-2}$	$1,71 \times 10^{-8}$	0,0136	0,4
C89V	$9,19 \times 10^3$	$7,78 \times 10^{-4}$	$8,47 \times 10^{-8}$	0,0257	2,0

Фиг. 36J

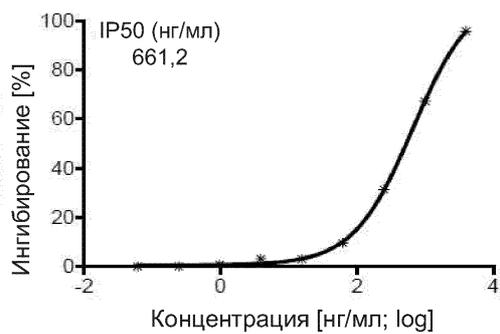


Фиг. 37А

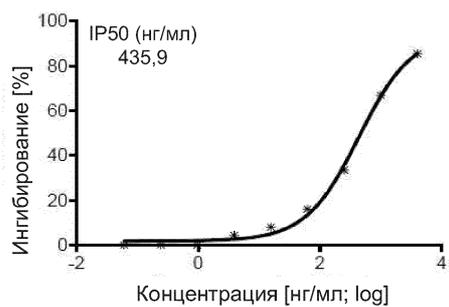


Фиг. 37В

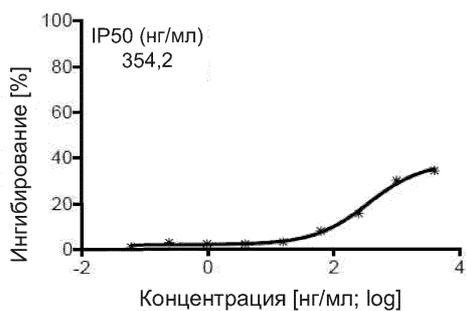
048010



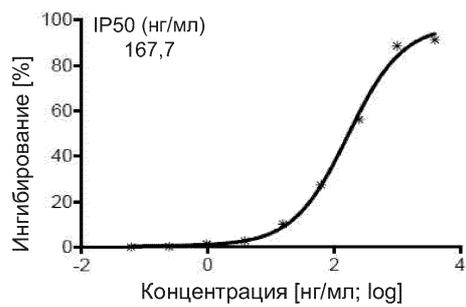
Фиг. 37С



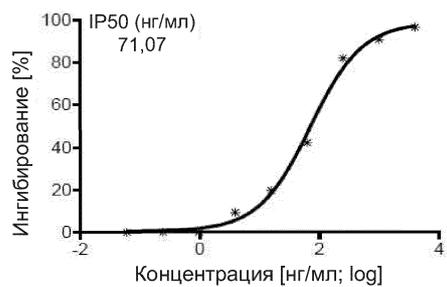
Фиг. 37D



Фиг. 37E

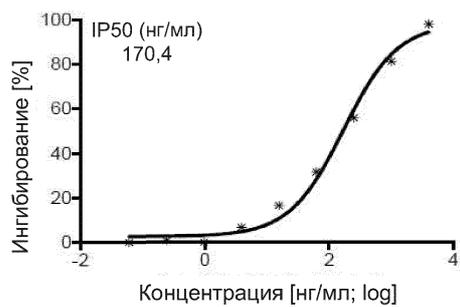


Фиг. 37F

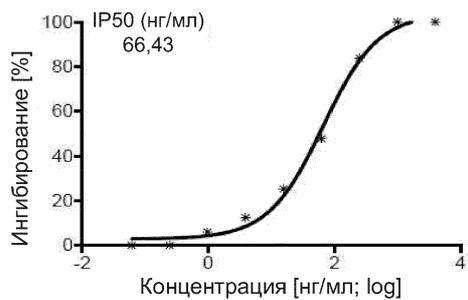


Фиг. 37G

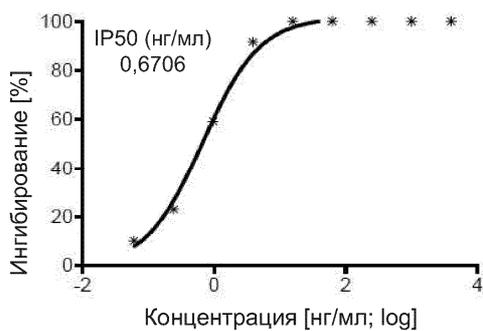
048010



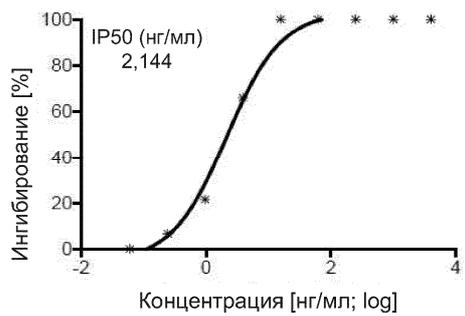
Фиг. 37H



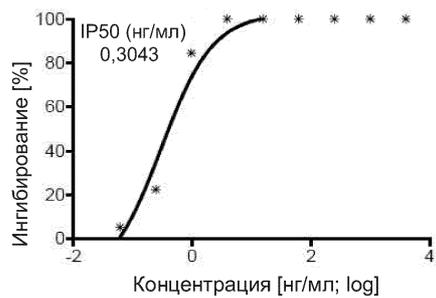
Фиг. 37I



Фиг. 38А

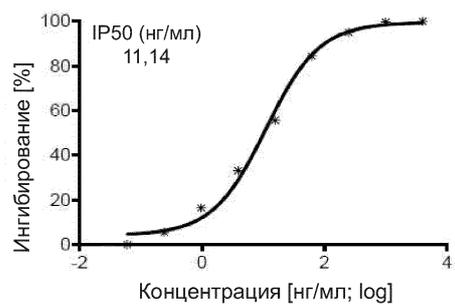


Фиг. 38В

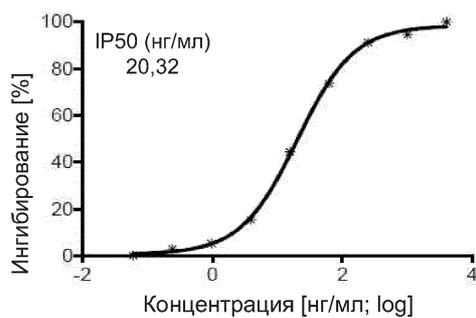


Фиг. 38С

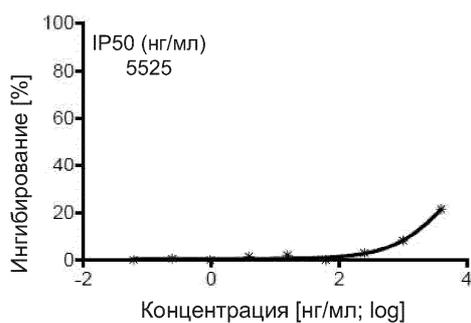
048010



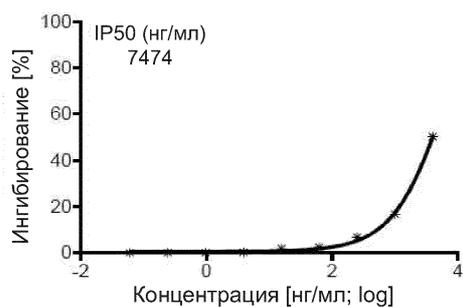
Фиг. 38D



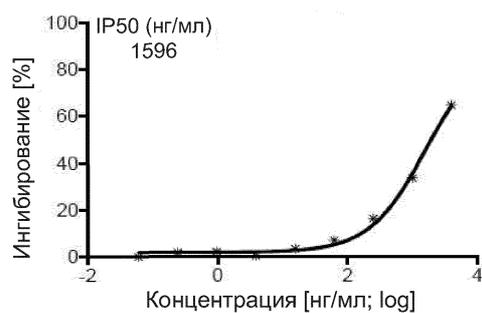
Фиг. 38E



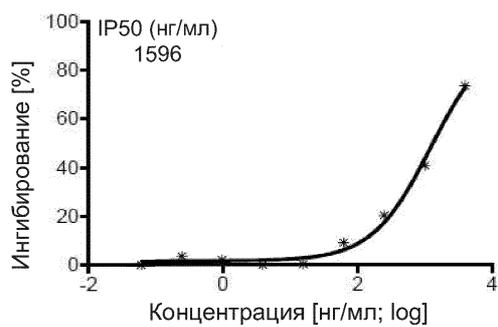
Фиг. 38F



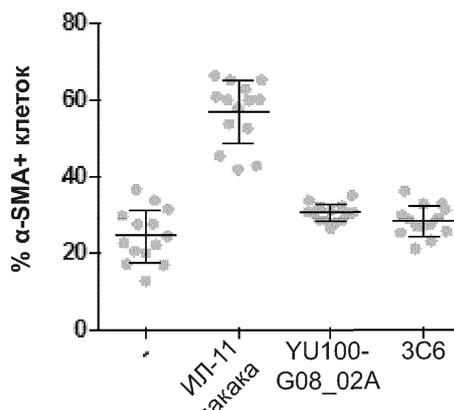
Фиг. 38G



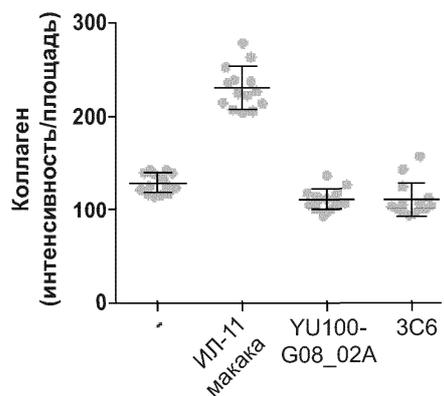
Фиг. 38H



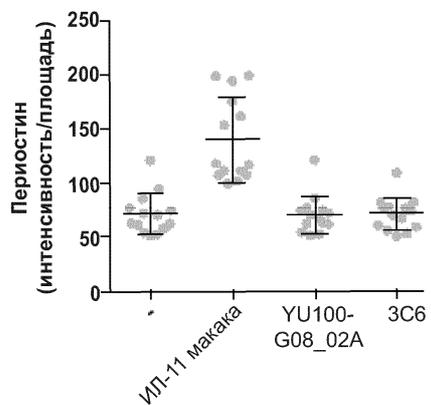
Фиг. 38I



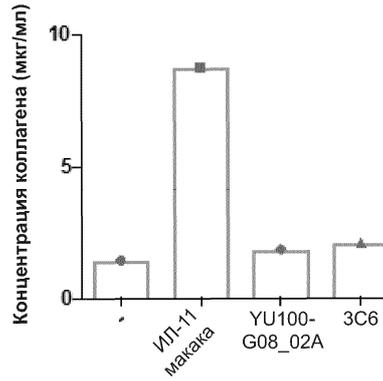
Фиг. 38J



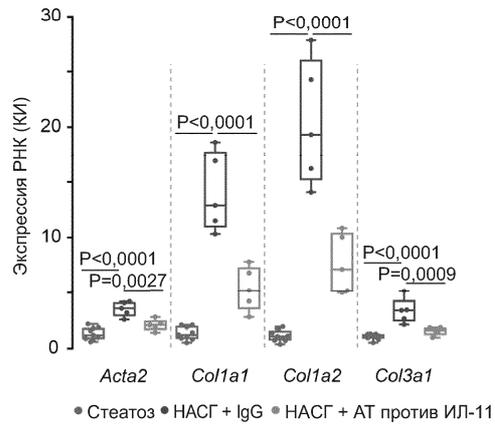
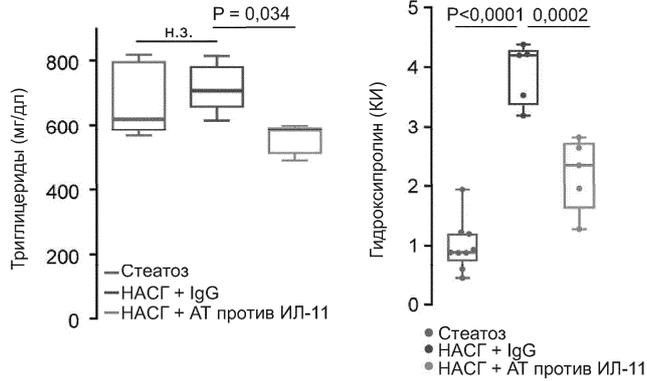
Фиг. 38K



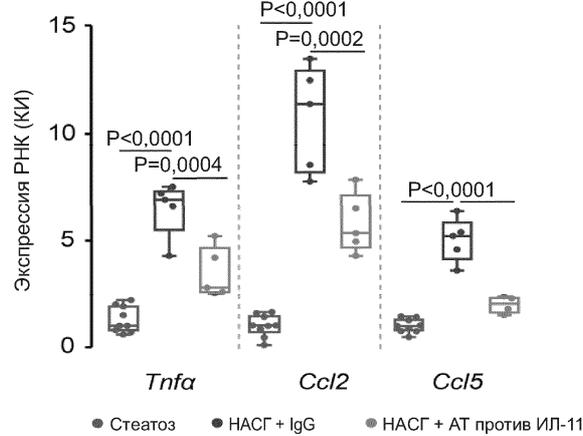
Фиг. 38L



Фиг. 38М

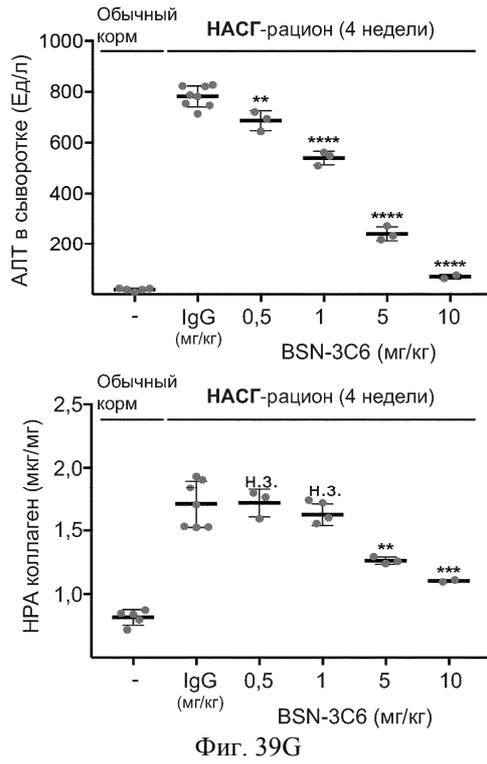
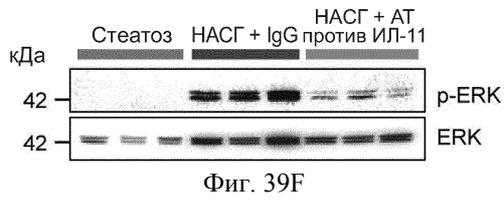
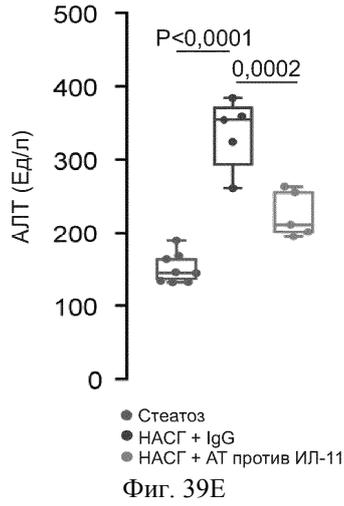


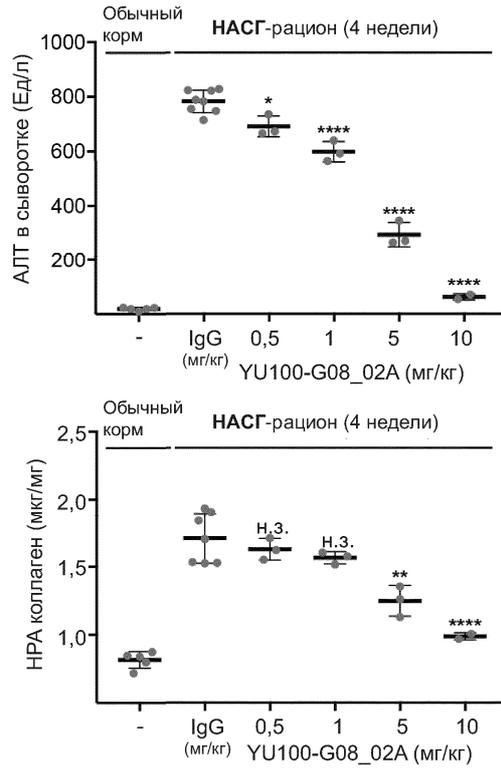
Фиг. 39А-С



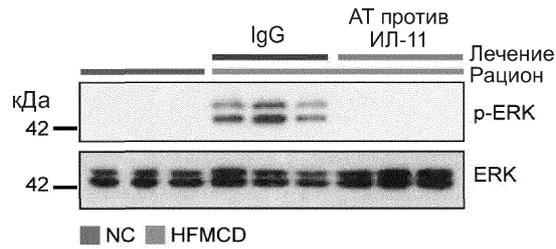
Фиг. 39D

048010

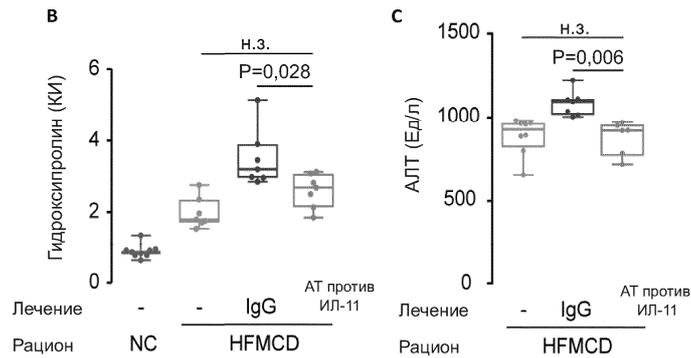




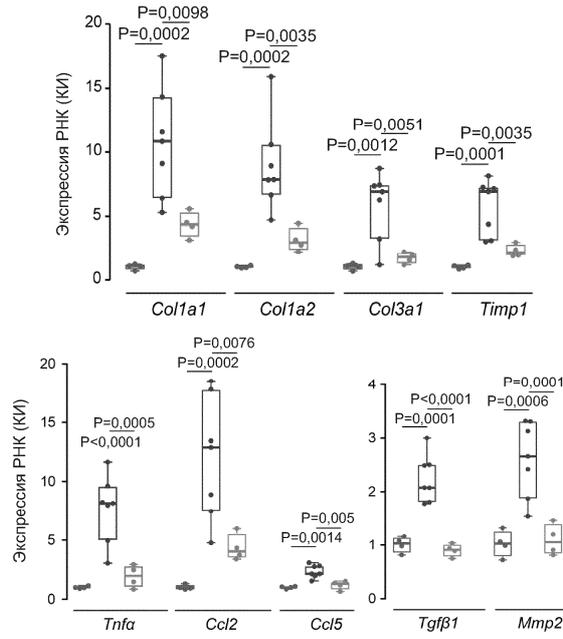
Фиг. 39Н



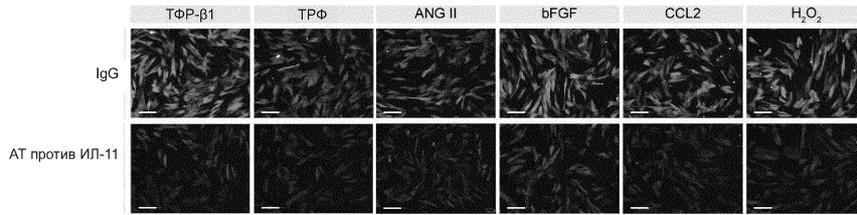
Фиг. 40А



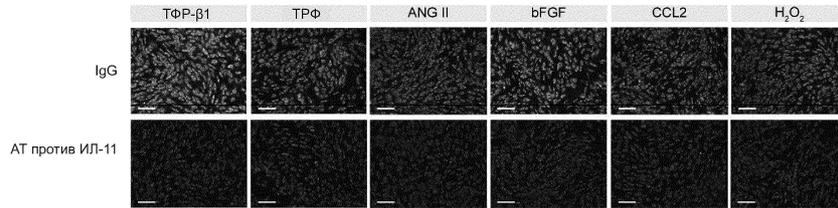
Фиг. 40В и С



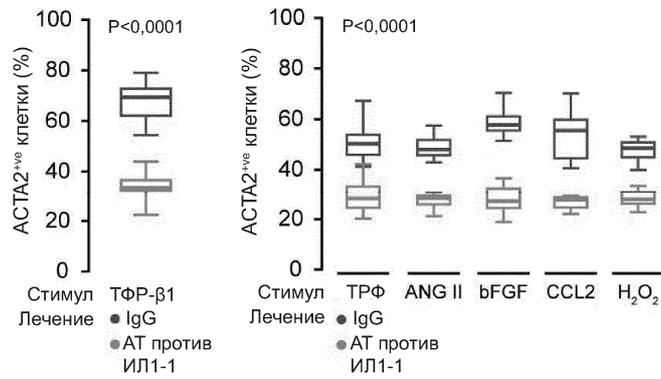
Фиг. 40D



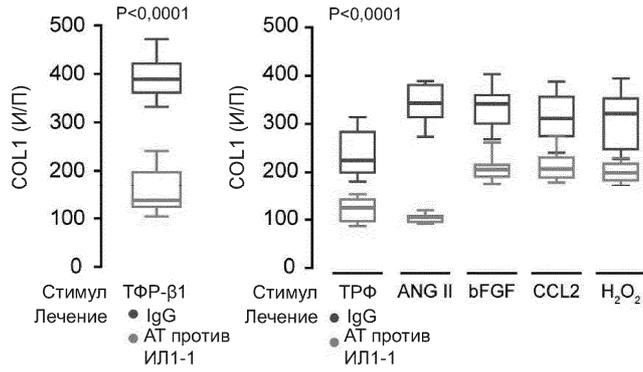
Фиг. 41А



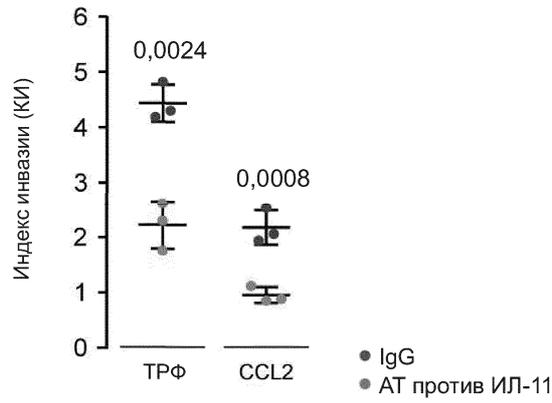
Фиг. 41В



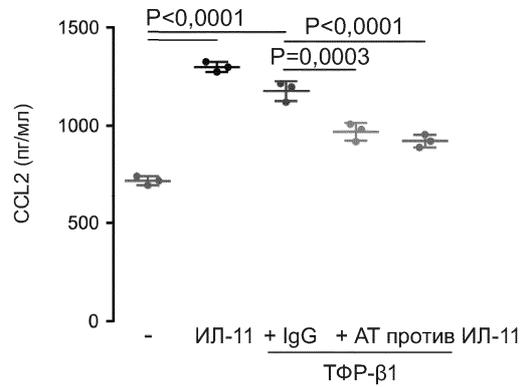
Фиг. 41С



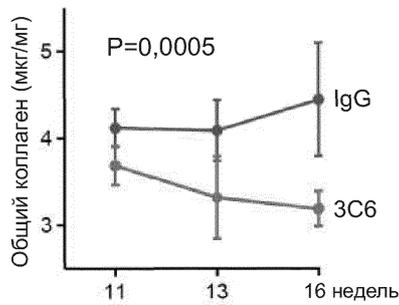
Фиг. 41D



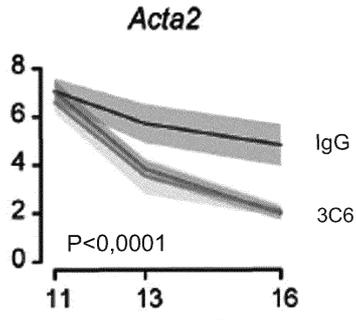
Фиг. 42



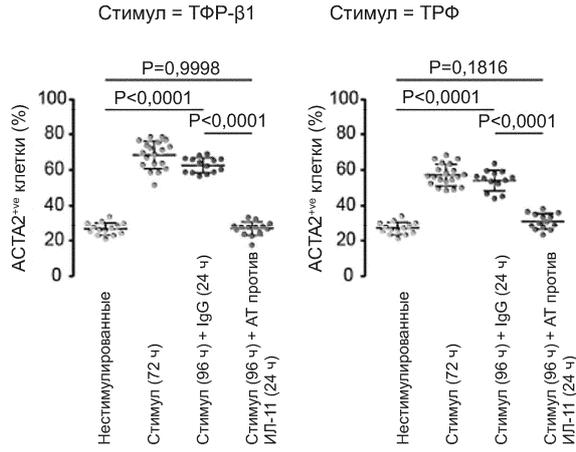
Фиг. 43



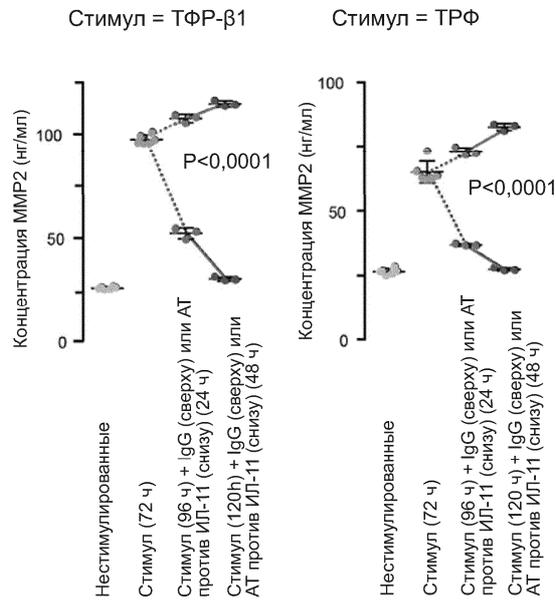
Фиг. 44А



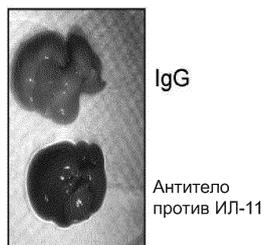
Фиг. 44В



Фиг. 44С

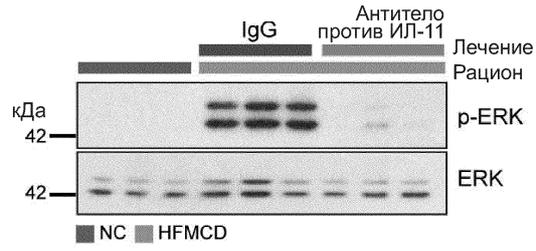


Фиг. 44D

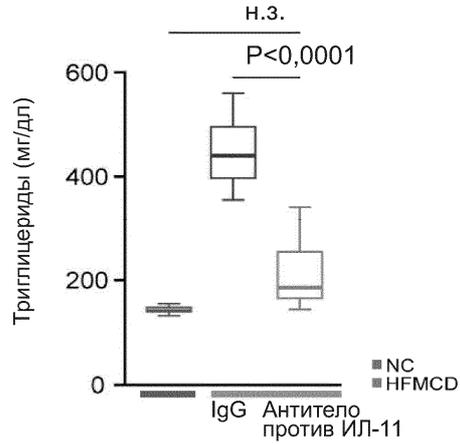


Фиг. 45А

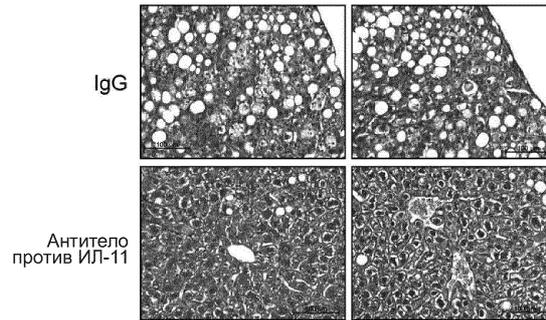
048010



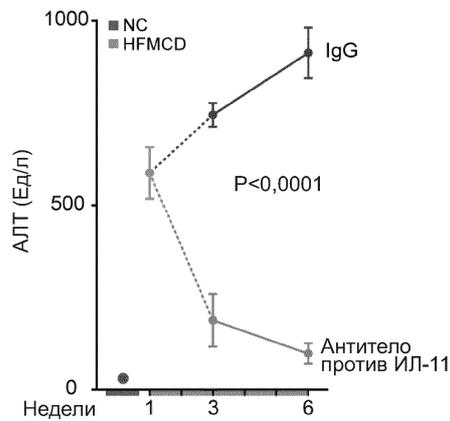
Фиг. 45В



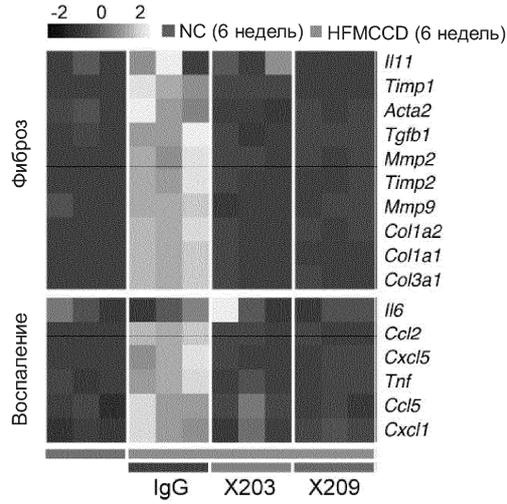
Фиг. 45С



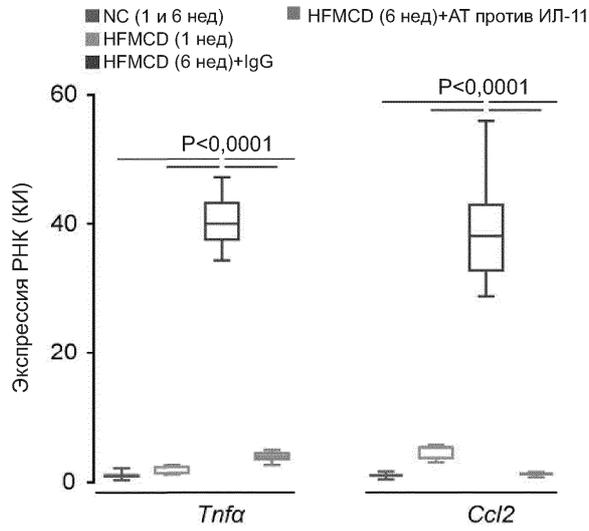
Фиг. 45D



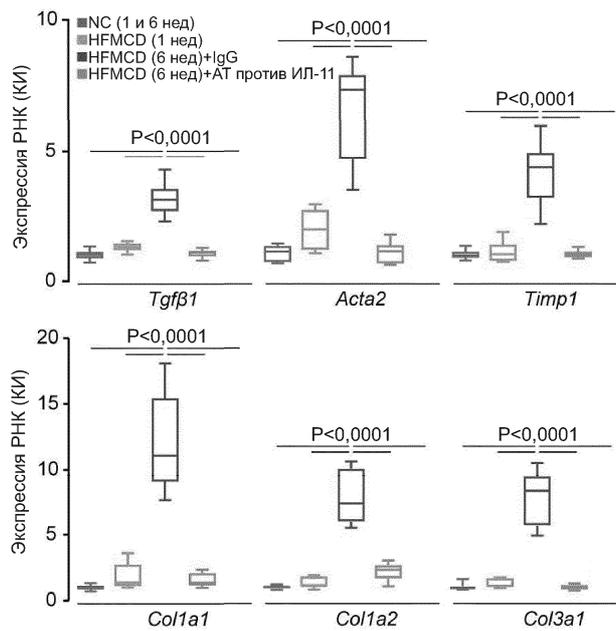
Фиг. 45Е



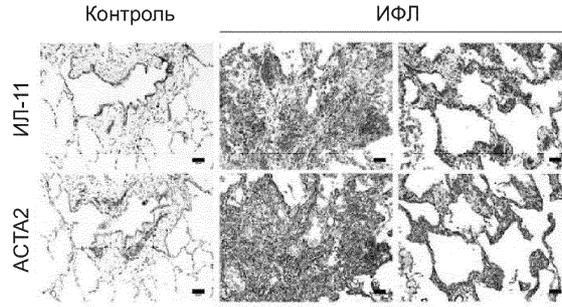
Фиг. 45F



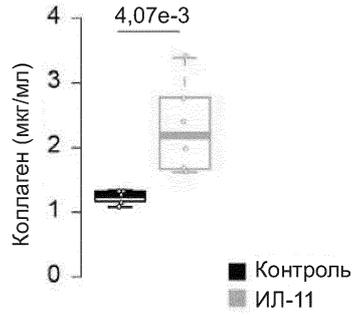
Фиг. 45G



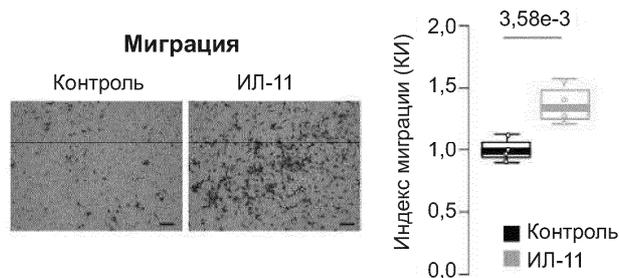
Фиг. 45H



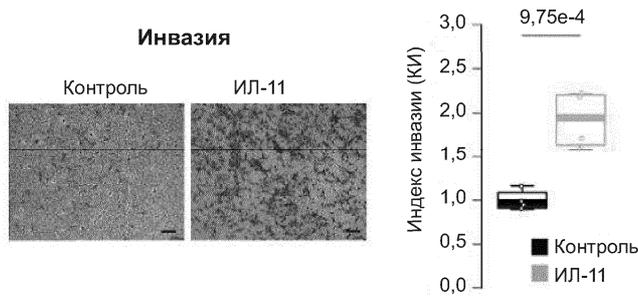
Фиг. 46А



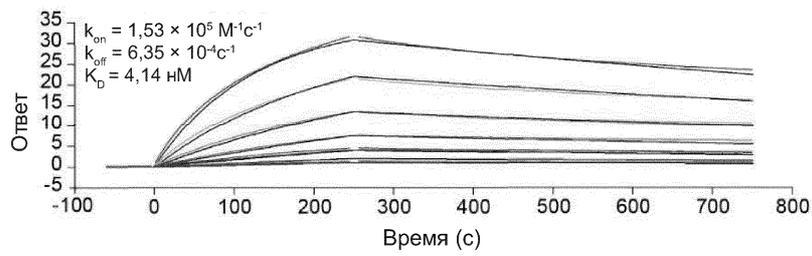
Фиг. 46В



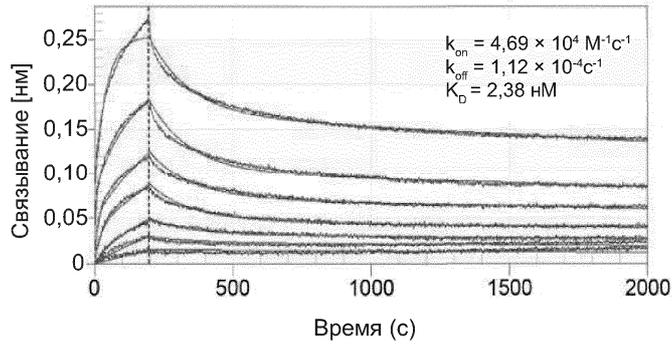
Фиг. 46С



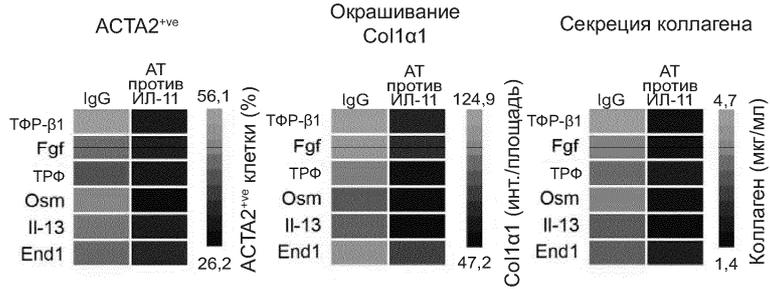
Фиг. 46D



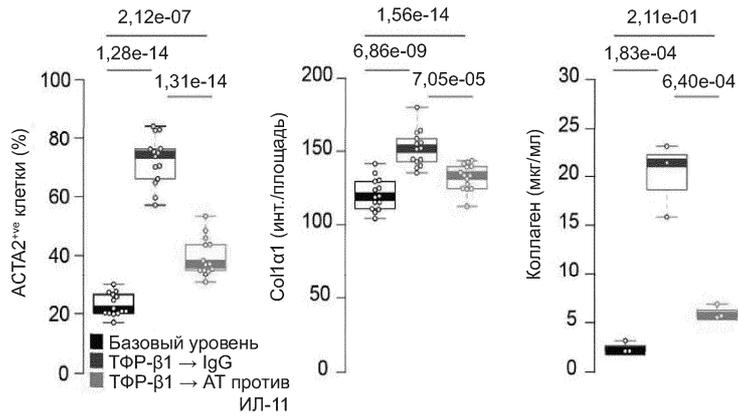
Фиг. 47А



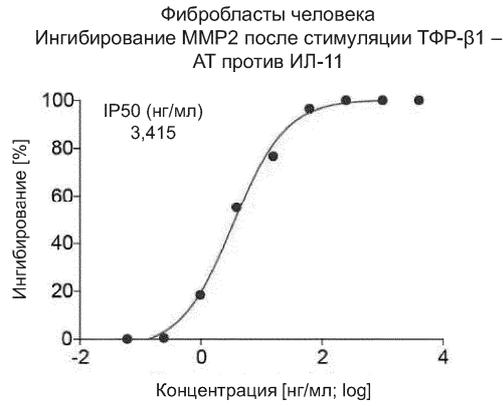
Фиг. 47В



Фиг. 48А

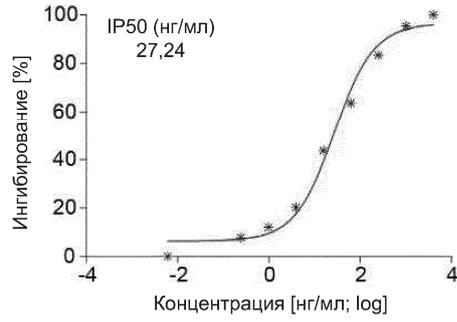


Фиг. 48В

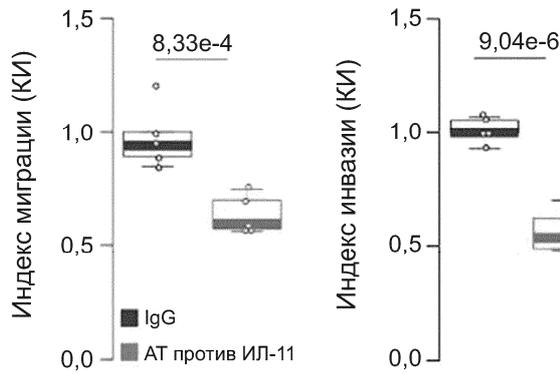


Фиг. 48С

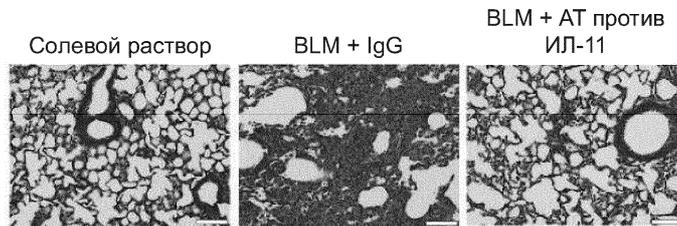
Фибробласты мыши
Ингибирование MMP2 после стимуляции TФP-β1 –
AT против ИЛ-11



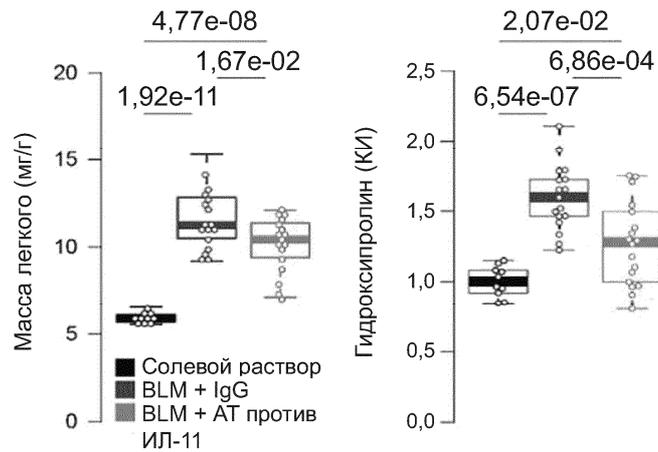
Фиг. 48D



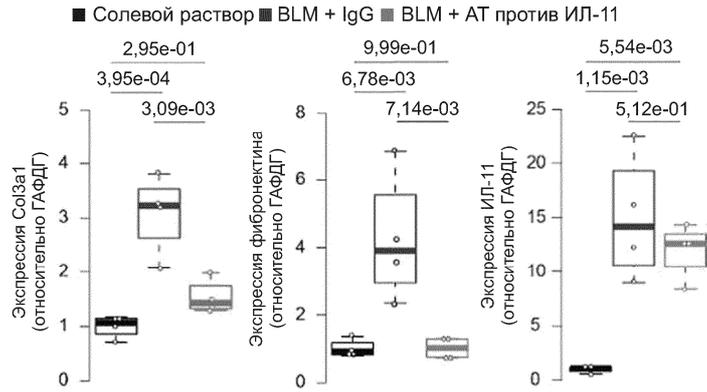
Фиг. 48E



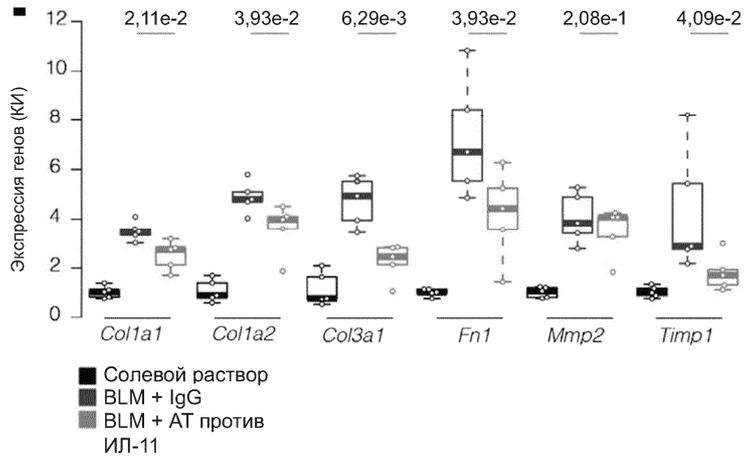
Фиг. 49А



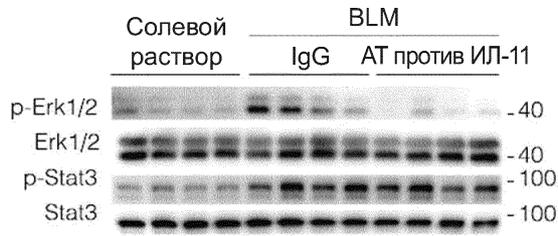
Фиг. 49В



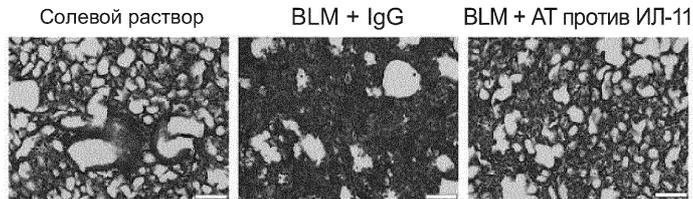
Фиг. 49С



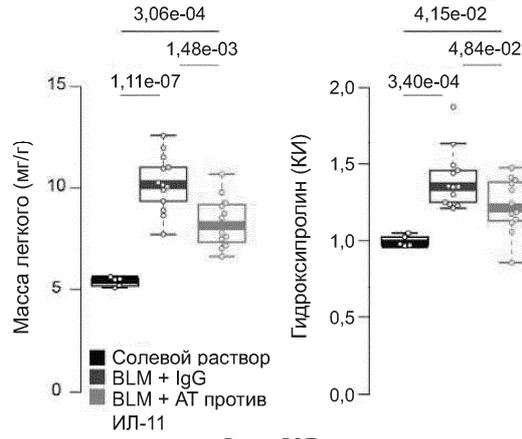
Фиг. 49D



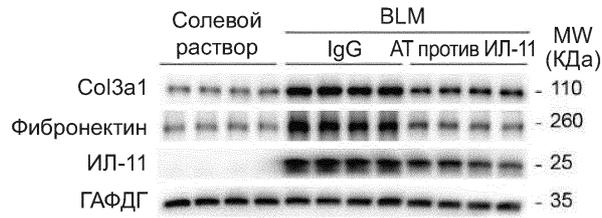
Фиг. 49Е



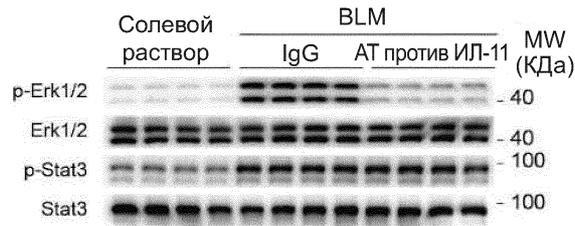
Фиг. 50А



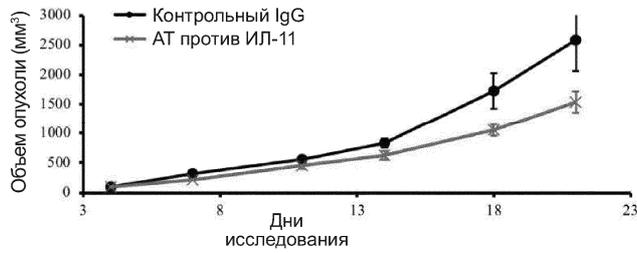
Фиг. 50В



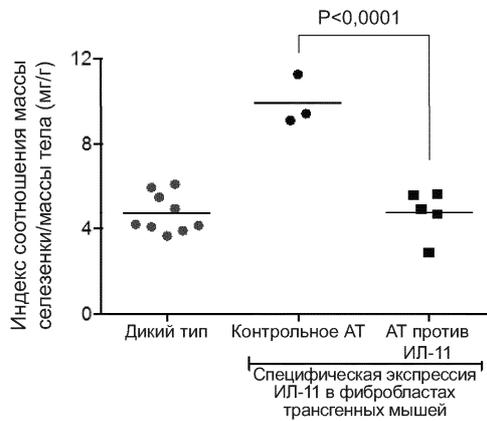
Фиг. 50С



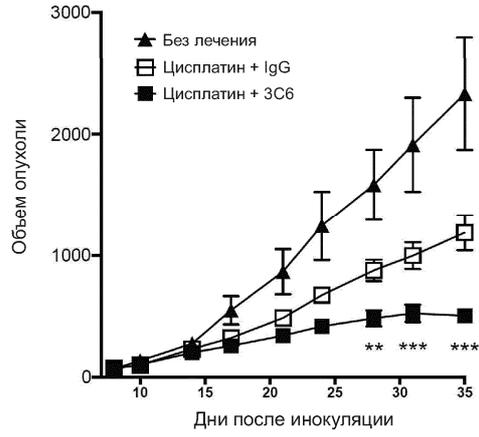
Фиг. 50D



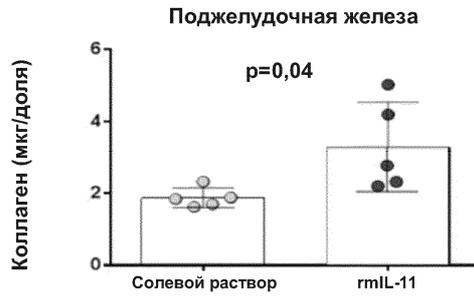
Фиг. 51А



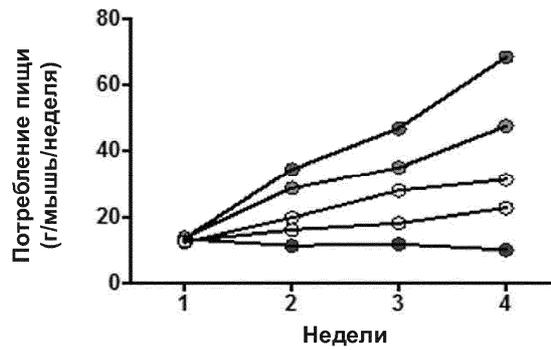
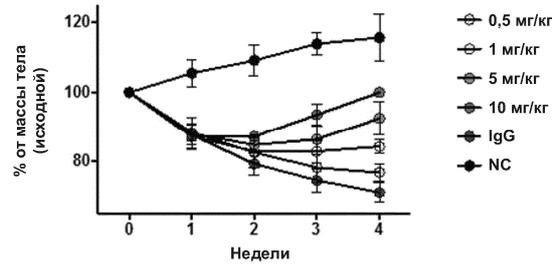
Фиг. 51В



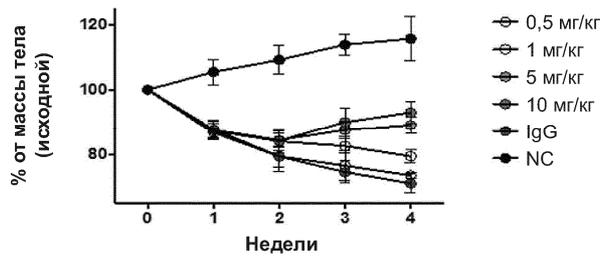
Фиг. 51С



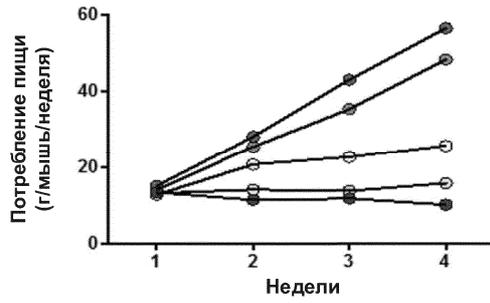
Фиг. 52



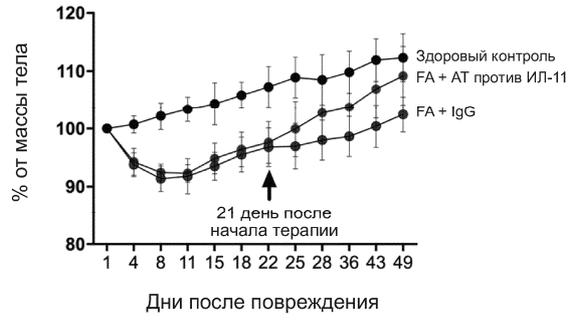
Фиг. 53А



048010

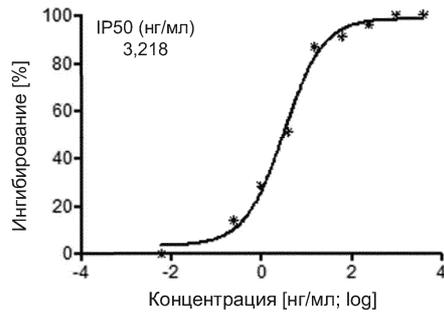


Фиг. 53В

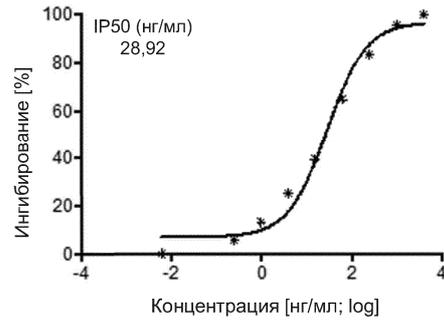


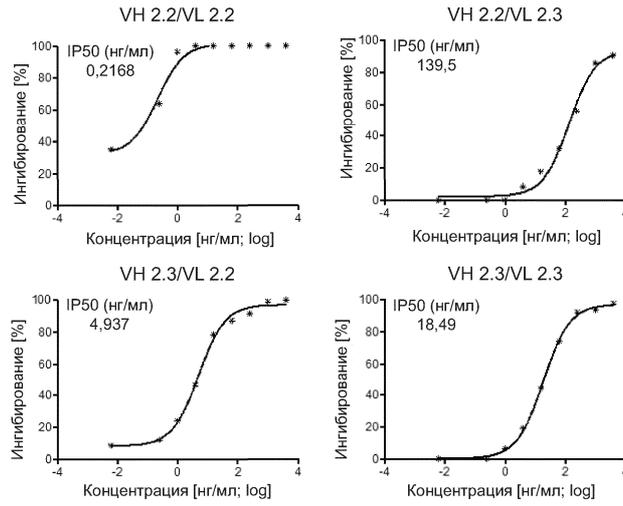
Фиг. 53С

VH 2.2/VL 2.1

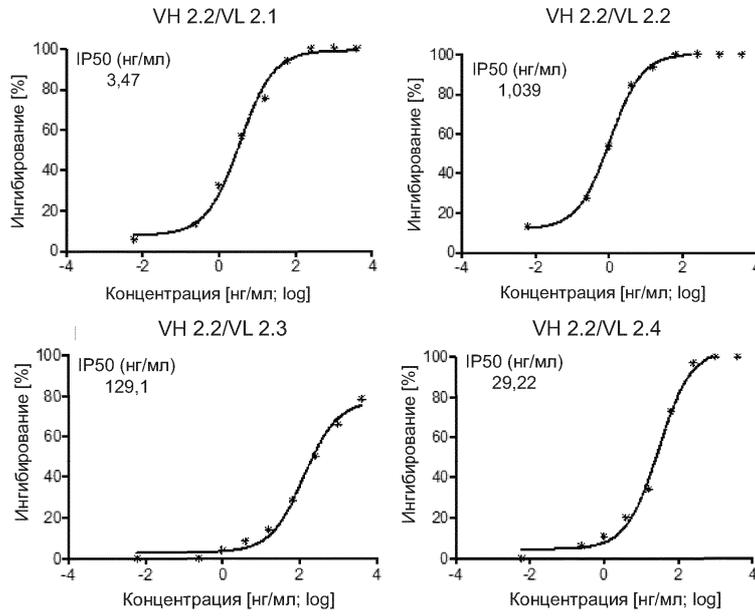


VH 2.2/VL 2.4

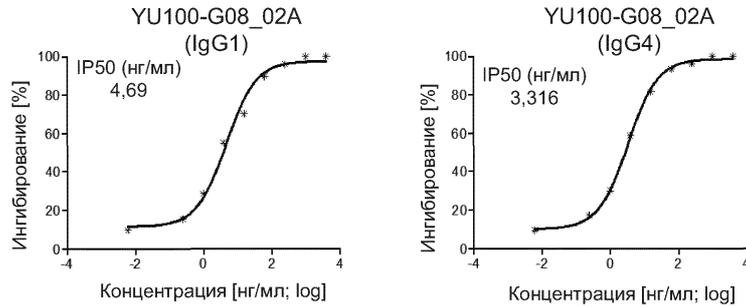




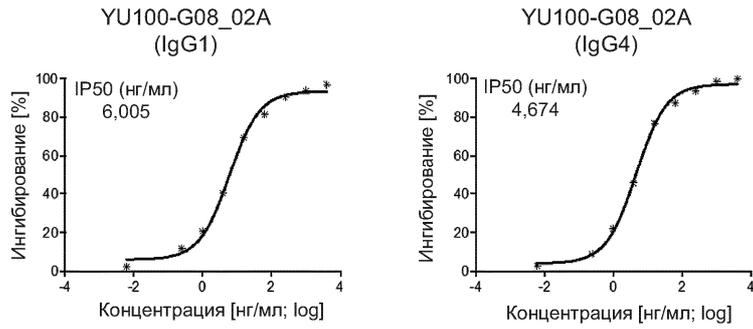
Фиг. 54А



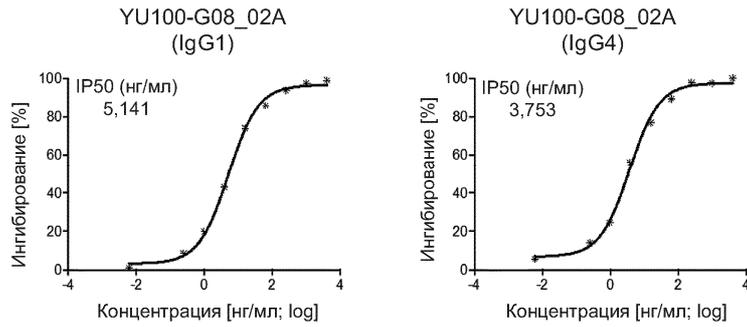
Фиг. 54В



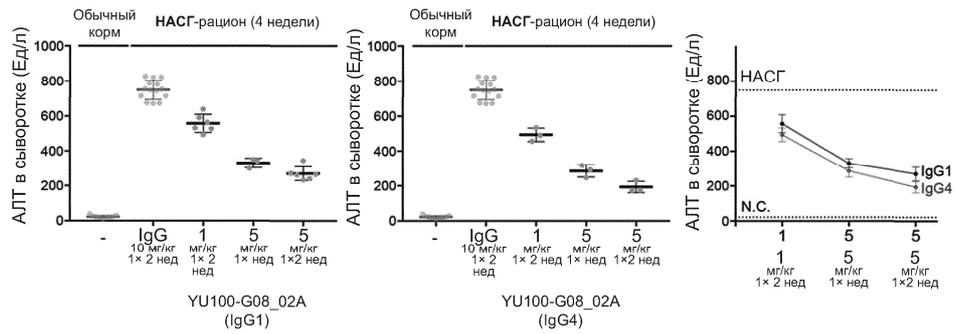
Фиг. 55А



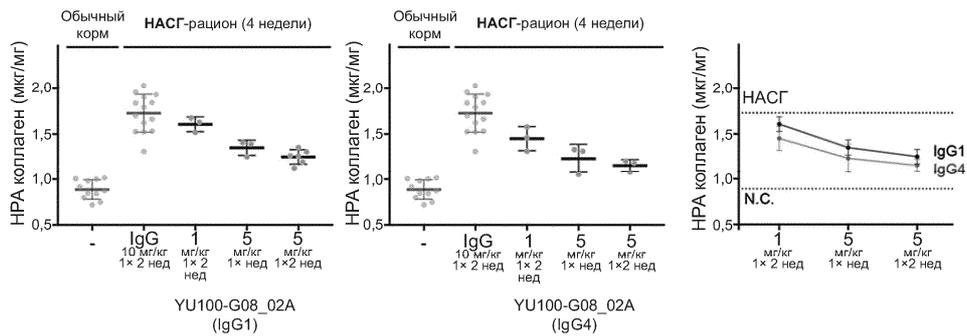
Фиг. 55В



Фиг. 55С



Фиг. 56А



Фиг. 56В

