

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3 298 040

"Trattamento della fibrosi"

Singapore Health Services Pte Ltd,
con sede a Singapore (Singapore), e
National University of Singapore,
con sede a Singapore (Singapore)

* * * * *

D E S C R I Z I O N E

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda la diagnosi ed il trattamento della fibrosi.

Sfondo dell'invenzione

La fibrosi è un processo essenziale che è una parte critica del risanamento della cicatrizzazione delle ferite. Fibrosi eccessiva è comune in molte condizioni di malattia rare e comuni ed è importante nella patogenesi della malattia. Le malattie caratterizzate da eccessiva fibrosi comprendono, senza limitazione: sclerosi sistemica, scleroderma, cardiomiopatia ipertrofica, cardiomiopatia dilatata (DCM), fibrillazione atriale, fibrillazione ventricolare, miocardite, cirrosi epatica, malattie renali, malattie degli occhi, asma, fibrosi cistica, artrite e fibrosi polmonare idiopatica. Nonostante il grosso impatto sulla salute degli esseri umani, approcci terapeutici e diagnostici alla fibrosi sono ancora una necessità medica non soddisfatta.

Il reale ruolo fisiologico dell'interleuchina 11 (IL-11) rimane

non chiaro. IL-11 è stata fortemente collegato con l'attivazione delle cellule ematopoietiche e con la produzione di piastrine, ma è stato anche trovato che è pro- ed anche antinfiammatorio, pro-angiogenico ed importante per la neoplasia. È noto che TGF β 1 o lesione di tessuti possono indurre l'espressione di IL-11 (Zhu M., et al., IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. PLOS ONE 10 (2015); Yashiro R., et al., Transforming growth factor-beta stimulates interleukin-11 production by human periodontal ligament and gingival fibroblast. J. Clin. Periodontol., 33, 165-71 (2006); Obana M., et al., Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. Circulation 121, 684-91 (2010); Tang W., Yang L., Yang Y.C., Leng S.X. E Elias J.A., Transforming growth factor-beta stimulates interleukin-11 transcription via complex activating protein-1-dependent pathways. J. Biol. Chem., 273, 5506-13 (1998)).

Il ruolo di IL-11 nella fibrosi non è chiaro dalla letteratura pubblicata. Si ritiene che IL-11 sia importante per la fibrosi e l'infiammazione del polmone (Tang W., et al., Targeted expression of IL-11 in the murine airways causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction. J. Clin. Invest., 98, 2845-53 (1996)) e che il suo livello di espressione sia correlato con i livelli di collagene nella pelle (Toda M., et al., Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 111, 875-881

(2003)) e nel sistema respiratorio (Molet S., Hamid Q. & Hamilos D., IL-11 and IL-17 expression in nasal polyps: Relationship to collagen deposition and suppression by intranasal fluticasone propionate. *The Laryngoscope*, 113 (2003); Minshall et al., IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 105 (2000)).

Tuttavia, la maggior parte degli studi suggerisce che IL-11 sia anti-fibrotico: nel cuore (Obana M., et al., Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation*, 121, 684-91 (2010); Obana M., et al., Therapeutic administration of IL-11 exhibits the preconditioning effects against ischemia-reperfusion injury via STAT3 in the heart. *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, 303, H569-77 (2012); US 2010/093976 A1) e nel rene (Stangou M., et al., Effect of IL-11 on glomerular expression of TGF-beta and extracellular matrix in nephrotoxic nephritis in Wistar Kyoto rats. *Journal of nephrology*, 24, 106-11 (2011); Ham A., et al., Critical role of interleukin-11 in isoflurane-mediated protection against ischemic acute kidney injury in mice. *Anesthesiology*, 119, 1389-401 (2013)) e sia antinfiammatorio in diversi tessuti e malattie infiammatorie croniche (Trepicchio & Dorner. *The therapeutic utility of interleukin-11 in the treatment of inflammatory disease* (1998). doi:10.1517/13543784.7.9.1501). La modalità di azione molecolare di IL-11 in generale si ritiene sia la

regolazione dell'espressione di RNA dei livelli di mRNA attraverso la trascrizione mediata da STAT3 (Zhu M., et al., IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. PLOS ONE 10 (2015)).

WO 98/36061 A2 descrive l'uso di agenti che inibiscono l'attività mediata dal recettore di IL-6 per il trattamento di ferite e fibrosi. WO 00/78336 A1 descrive metodi per il trattamento o l'inibizione di formazione di fibrosi nei tessuti utilizzando antagonisti di IL-13.

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione fornisce un anticorpo che è in grado di legarsi ad interleuchina 11 (IL-11) o al recettore α di IL-11 (IL-11R α) e inibire la segnalazione mediata da IL-11, per l'uso in un metodo per il trattamento o prevenzione della fibrosi in un essere umano, come definito nelle rivendicazioni.

La presente divulgazione riguarda il trattamento, prevenzione o alleviamento della fibrosi in un soggetto che necessita di trattamento attraverso la somministrazione di un agente in grado di inibire l'azione dell'interleuchina 11 (IL-11). Gli inventori hanno identificato che IL-11 ha un'azione pro-fibrotica. La presente divulgazione riguarda in particolare l'inibizione dell'azione pro-fibrotica di IL-11. Forme di realizzazione della presente divulgazione riguardano l'inibizione o la prevenzione del segnale pro-fibrotico mediato da IL-11, ad es. mediato dal legame di IL-11 ad un recettore di IL-11.

Gli agenti qui descritti in grado di inibire l'azione di IL-11 possono prevenire o ridurre il legame di IL-11 al recettore di IL-11.

Gli agenti qui descritti in grado di inibire l'azione di IL-11 possono legarsi IL-11 per formare un complesso che comprende l'agente ed IL-11. Il complesso può essere un complesso non covalente o covalente. In alcune forme di realizzazione, la formazione del complesso agente:IL-11 può prevenire o ridurre la capacità di IL-11 di legarsi ad un recettore di IL-11. In alcune forme di realizzazione, tale prevenzione o riduzione può essere il risultato di una riduzione del legame produttivo di IL-11 ad un recettore di IL-11, cioè la riduzione della capacità di IL-11 di iniziare una segnalazione mediata dal recettore di IL-11. In alcune forme di realizzazione, la formazione del complesso agente:IL-11 può sequestrare IL-11 dal recettore di IL-11, così da prevenire o ridurre il contatto di IL-11 con un recettore di IL-11 e/o prevenire o ridurre la quantità di IL-11 disponibile per il legame ad un recettore di IL-11. In alcune forme di realizzazione, l'agente può essere un decoy receptor o recettore decoy (recettore esca).

Gli agenti qui descritti in grado di inibire l'azione di IL-11 possono legarsi ad un recettore di IL-11. Un agente che si lega ad un recettore di IL-11 può impedire o ridurre la capacità di IL-11 di legarsi ad un recettore di IL-11 (IL-11R).

Si descrive qui anche il trattamento, prevenzione o alleviamento della fibrosi in un soggetto che necessita di tale trattamento attraverso la somministrazione di un agente in grado di prevenire o

ridurre l'espressione di IL-11 o di un recettore di IL-11 (IL-11R).

Si descrive qui anche un agente in grado di inibire l'azione di interleuchina 11 (IL-11) per l'uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi.

Pure descritto qui è l'uso di un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 nella produzione di un medicinale per uso in un metodo per il trattamento o prevenzione della fibrosi.

Si descrive qui anche un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi, il metodo comprendendo il somministrare ad un soggetto che necessita del trattamento, una quantità terapeuticamente efficace di un agente in grado di inibire l'azione di IL-11.

In alcune forme di realizzazione, l'agente in grado di inibire l'azione di IL-11 è un agente in grado di prevenire o ridurre il legame di IL-11 ad un recettore di IL-11.

In alcune forme di realizzazione, l'agente in grado di inibire l'azione di IL-11 è un agente di legame di IL-11. Gli agenti di legame di IL-11 possono essere scelti dal gruppo che consiste di: un anticorpo, polipeptide, peptide, oligonucleotide, aptamero o piccola molecola. In alcune forme di realizzazione, l'agente di legame di IL-11 è un anticorpo. In alcune forme di realizzazione, l'agente di legame di IL-11 è un decoy receptor.

In alcune forme di realizzazione, l'agente in grado di inibire l'azione di IL-11 è un agente di legame del recettore di IL-11 (IL-11R). Gli agenti di legame di IL-11R possono essere scelti dal gruppo

che consiste di: un anticorpo, polipeptide, peptide, oligonucleotide, aptamero o piccola molecola. In alcune forme di realizzazione, l'agente di legame di IL-11R è un anticorpo.

Si descrive qui anche un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o di IL-11R per uso in un metodo per il trattamento della fibrosi.

Si descrive qui anche l'uso di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o di IL-11R nella produzione di un medicinale per uso in un metodo di trattamento o prevenzione della fibrosi.

Si descrive qui anche un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi, il metodo comprendendo il somministrare ad un soggetto che necessita del trattamento, una quantità terapeuticamente efficace di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o di IL-11R.

In alcune forme di realizzazione, l'agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o di IL-11R è una piccola molecola o oligonucleotide.

In alcune forme di realizzazione, la fibrosi da trattare o prevenire è fibrosi del cuore, del fegato o del rene. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi da trattare o prevenire è la fibrosi dell'occhio. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi è nel cuore ed è associata con disfunzione della muscolatura o proprietà elettriche del cuore o ispessimento delle pareti o valvole del cuore. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi è nel fegato ed è

associata con la malattia cronica epatica o cirrosi epatica. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi è nel rene ed è associata alla malattia renale cronica.

In alcune forme di realizzazione, il metodo per il trattamento o la prevenzione comprende somministrare un detto agente ad un soggetto in cui l'espressione di IL-11 o di IL-11R è sovra-regolata. In alcune forme di realizzazione, il metodo per il trattamento o la prevenzione comprende somministrare un detto agente ad un soggetto in cui si è determinato che la regolazione di IL-11 o di IL-11R è sovra-regolata. In alcune forme di realizzazione, il metodo per il trattamento o la prevenzione comprende determinare se l'espressione di IL-11 o di IL-11R è sovra-regolata nel soggetto e somministrare detto agente ad un soggetto in cui l'espressione di IL-11 o di IL-11R è sovra-regolata.

Si divulga qui anche un metodo per determinare l'adeguatezza di un soggetto al trattamento o prevenzione di fibrosi con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11, il metodo comprendendo determinare, opzionalmente *in vitro*, se o meno l'espressione di IL-11 o IL-11R è sovra-regolata nel soggetto.

Si divulga qui anche un metodo per selezionare un soggetto per il trattamento o la prevenzione della fibrosi con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11, il metodo comprendendo determinare, opzionalmente *in vitro*, se o meno l'espressione di IL-11 o IL-11R è sovra-regolata nel soggetto.

Si divulga qui anche un metodo per la diagnosi della fibrosi o un rischio di sviluppare la fibrosi in un soggetto, il metodo

comprendendo determinare, opzionalmente *in vitro*, la sovra-regolazione di IL-11 o di IL-11R in un campione ottenuto nel soggetto.

In alcune forme di realizzazione, il metodo è un metodo per confermare una diagnosi di fibrosi in un soggetto che si sospetta abbia la fibrosi.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre selezionare il soggetto per il trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o con un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o di IL-11R.

Si descrive qui anche un metodo per fornire una prognosi per un soggetto che ha, o che si sospetta abbia la fibrosi, il metodo comprendendo determinare, opzionalmente *in vitro*, se IL-11 o IL-11R è sovra-regolata in un campione ottenuto dal soggetto e, sulla base della determinazione, fornire una prognosi per il trattamento del soggetto con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o con un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o di IL-11R.

Il metodo può comprendere inoltre selezionare un soggetto che è determinato avere IL-11 o IL-11R sovra-regolata per il trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o con un agente in grado di impedire o ridurre l'espressione di IL-11 o di IL-11R.

Si descrive qui anche un metodo per la diagnosi della fibrosi o un rischio di sviluppare la fibrosi in un soggetto, il metodo comprendendo determinare, opzionalmente *in vivo*, uno o più fattori

genetici nel soggetto che sono predittivi di sovra-regolazione dell'espressione di IL-11 o di IL-11R o della sovra-regolazione dell'attività di IL-11 o di IL-11R.

In alcune forme di realizzazione, il metodo è un metodo per confermare una diagnosi di fibrosi in un soggetto che si sospetta abbia la fibrosi.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre selezionare il soggetto per il trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o con un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R.

Si descrive qui anche un metodo per fornire una prognosi per un soggetto che ha o che si sospetta abbia la fibrosi, il metodo comprendendo il determinare, opzionalmente *in vitro*, uno o più fattori genetici nel soggetto, che sono predittivi della sovra-regolazione dell'espressione di IL-11 o di IL-11R o della sovra-regolazione dell'attività di IL-11 o di IL-11R.

Si descrive qui anche un metodo per il trattamento della fibrosi in un soggetto umano, il metodo comprendendo somministrare ad un soggetto umano che necessita del trattamento, una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo anti-interleuchina 11 (IL-11), in cui l'anticorpo anti-IL-11 si lega ad il IL-11 ed inibire la segnalazione mediata da IL-11.

Si divulga qui anche un metodo per il trattamento della fibrosi in un soggetto, il metodo comprendendo:

(i) determinare, opzionalmente *in vitro*, se l'espressione di IL-

IL-11 o di un recettore dell'interleuchina 11 (IL-11) è sovra-regolata nel soggetto; e

(ii) somministrare ad un soggetto in cui l'espressione di IL-11 o di IL-11R è sovra-regolata, una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo anti-IL-11, in cui l'anticorpo anti-IL-11 si lega ad IL-11 e inibisce la segnalazione mediata da IL-11.

Si descrive qui anche un metodo per il trattamento della fibrosi in un soggetto, il metodo comprendendo:

(i) determinare, opzionalmente *in vitro*, uno o più fattori genetici nel soggetto che sono predittivi della sovra-regolazione dell'espressione o dell'attività di interleuchina 11 (IL-11) o del recettore di interleuchina 11 (IL-11R);

(ii) selezionare un soggetto per il trattamento sulla base della determinazione in (i); e

(iii) somministrare al soggetto scelto una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo anti-IL-11, in cui l'anticorpo anti-IL-11 si lega a IL-11 ed inibisce la segnalazione mediata da IL-11.

Descrizione

IL-11 e recettore di IL-11

L'interleuchina 11 (IL-11), anche nota come fattore di inibizione di adipogenesi, è una citochina pleiotropica ed un membro della famiglia di IL-6 delle citochine e comprende IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, oncostatina, fattore inibitorio della leucemia (LIF), cardiotropina 1 (CT-1), citochina cardiotropina-simile (CLC), fattore

neurotrofico ciliare (CNTF) e neuropoietina (NP-1).

IL-11 viene trascritta con un peptide a segnale canonico che garantisce efficiente secrezione dalle cellule. La forma immatura di IL-11 umana è un polipeptide da 199 amminoacidi, mentre la forma matura di IL-11 codifica una proteina di 178 residui di amminoacidi (Garbers e Scheller, Biol. Chem., 2013; 394(9):1145-1161). La sequenza di amminoacidi di IL-11 umana è disponibile con il numero di accessione UniProt P20809 (P20809.1 GI:124294). IL-11 umana ricombinante (oprelvekin) è pure disponibile in commercio. IL-11 da altre specie, comprese topo, ratto, maiale, mucca, diverse specie di pesci ossei e primati, sono pure state clonate e sequenziate.

In questo testo, IL-11 si riferisce a IL-11 da qualsiasi specie e comprende isoforme, frammenti, varianti o omologhi di una IL-11 da una qualsiasi specie. In forme di realizzazione preferite, la specie è umana (*Homo sapiens*). Le isoforme, frammenti, varianti o omologhi di una IL-11 possono opzionalmente essere caratterizzati come aventi almeno il 70%, preferibilmente uno di 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza di amminoacidi con la sequenza di amminoacidi di IL-11 immatura o matura da una data specie, ad es. umana. Le isoforme, frammenti, varianti o omologhi di IL-11 possono opzionalmente essere caratterizzati dalla capacità di legare IL-11 α (preferibilmente dalla medesima specie) e stimolare la trasduzione ed il segnale in cellule che esprimono IL-11R α e gp130 (ad es. come descritto in Curtis et al., Blood, 1997, 90(11); o in Karpovich et al., Mol. Hum. Reprod., 2003, 9(2):75-80).

Un frammento di IL-11 può essere di qualsiasi lunghezza (per numero di amminoacidi), sebbene opzionalmente possa essere almeno il 25% della lunghezza di IL-11 matura e può avere una lunghezza massima del 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% della lunghezza di IL-11 matura. Un frammento di IL-11 può avere una lunghezza minima di 10 amminoacidi ed una lunghezza massima di 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 195 amminoacidi.

IL-11 segnala attraverso un omodimero di una glicoproteina 130 del recettore β in modo ubiquitario (gp130; nota anche come glicoproteina 130, IL6ST, IL6-beta o CD130). Gp130 è una proteina di membrana che forma una sotto-unità dei recettori di citochina di tipo I con la famiglia del recettore di IL-6. La specificità viene ottenuta attraverso un recettore di IL-11 α individuale (IL-11R α), che non partecipa direttamente alla transduzione del segnale, sebbene l'evento di legame di citochina iniziale al recettore α porti alla formazione finale del complesso con i recettori β . IL-11 attiva un percorso di segnalazione a valle che è principalmente una cascata di protein chinasi attivata dal mitogeno (MAPK) e percorso di Janus chinasi/transduttore/transduttore di segnale e attivatore di trascrizione (Jak/STAT) (Garbers e Scheller, sopra).

gp130 umana (che comprende il peptide segnale da 22 amminoacidi) è una proteina di 918 amminoacidi e la forma matura è di 866 amminoacidi, comprendente un dominio extracellulare di 597 amminoacidi, un dominio di membrana di 22 amminoacidi ed un

dominio intracellulare di 277 amminoacidi. Il dominio extracellulare della proteina comprende il modulo di legame di citochina (CBM) di gp130. Il CBM di gp130 comprende il dominio D1 Ig-simile ed il dominio D2 e D3 fibronectina tipo III di gp130. La sequenza di amminoacidi di gp130 umana è disponibile da Genbank al numero di accessione NP_002175.2.

IL-11R α umano è un polipeptide da 422 amminoacidi (Genbank numero di accessione NP_001136256.1 GI:218505839) e condivide -85% di identità di nucleotide e sequenza di amminoacidi con IL-11R α murino (Du e Williams, Blood, Vol. 89, N. 11, 1 giugno 1997). Due isoforme di IL-11R α sono state riportate, che differiscono nel dominio citoplasmatico (Du e Williams, *sopra*). La catena α del recettore di IL-11 (IL-11R α) condivide molte similarità strutturali e funzionali con la catena del recettore α di IL-6 (il-6R α). Il dominio extracellulare mostra il 24% di identità di amminoacidi compreso il motivo Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) caratteristico conservato. Il dominio citoplasmatico corto (34 amminoacidi) manca delle regioni Box 1 e 2 che sono richieste per l'attivazione del percorso di segnalazione di JAK/STAT.

IL-11R α lega il suo ligando con bassa affinità (Kd ~ 10 nmoli/L) e da solo è insufficiente a trasdurre un segnale biologico. La generazione di un recettore ad alta affinità (Kd ~ 400-800 pmoli/L) in grado di compiere trasduzione di segnale richiede la co-espressione di IL-11R α e di gp130 (Curtis et al. (Blood, 1 dicembre 1997; 90(11):4403-12; Hilton et al., EMBO J., 13:4765, 1994;

Nandurkar et al., *Oncogene*, 12:585, 1996). Il legame di IL-11 a IL-11R α di superficie cellulare induce l'eterodimerizzazione, la fosforilazione della tirosina, l'attivazione di gp130 e di MAPK e/o la segnalazione di Jak/STAT come descritto sopra.

I siti di legame del recettore su IL-11 murina sono stati mappati e sono stati identificati tre siti - siti I, II e III. Il legame a gp130 è ridotto da sostituzioni nella regione del sito II e da sostituzioni nella regione del sito III. Mutanti del sito III non mostrano attività agonistica rivelabile ed hanno attività antagonista di IL-11R α (*Cytokine Inhibitors*, Capitolo 8, edito da Gennaro Ciliberto e Rocco Savino, Marcel Dekker, Inc., 2001).

In linea di principio, un IL-11R α solubile può anche formare complessi solubili biologicamente attivi con IL-11 (Pflanz et al., 1999, *FEBS Lett.*, 450, 117-122) aumentando la possibilità che, analogamente ad IL-6, IL-11 possa in alcuni casi legarsi ad IL-11R α solubile prima di legarsi a gp130 di superficie cellulare (Garbers e Scheller, *sopra*). Curtis et al. (*Blood*, 1 dicembre 1997; 90(11):4403-12) descrivono l'espressione di una catena alfa del recettore di IL-11 murino solubile (sIL-11) ed hanno esaminato la segnalazione in cellule che esprimono gp130. In presenza di gp130, ma non di IL-11R di transmembrana, la differenziazione dipendente da IL-11 mediata da IL-11R delle cellule leucemiche M1 e la proliferazione in cellule Ba/F3 ed eventi intracellulari precoce compresi la fosforilazione di gp130, STAT3 e SHP2 è simile alla segnalazione attraverso IL-11R di transmembrana.

In questo testo, un recettore di IL-11 (IL-11R) si riferisce ad un polipeptide in grado di legarsi a IL-11 ed indurre transduzione di segnale in cellule che esprimono gp130. Un recettore di IL-11 può essere da qualsiasi specie e comprende isoforme, frammenti, varianti o omologhi di un recettore di IL-11 da una qualsiasi specie. In forme di realizzazione preferite, la specie è umana (*Homo sapiens*). In alcune forme di realizzazione, il recettore di IL-11 può essere IL-11R α . Isoforme, frammenti, varianti o omologhi di IL-11R α possono opzionalmente essere caratterizzati dall'aver almeno il 70%, preferibilmente uno di 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% di identità di sequenza di amminoacidi con la sequenza di amminoacidi di IL-11R α da una data specie. Ad es. umana. Isoforme, frammenti, varianti o omologhi di un IL-11R α possono opzionalmente essere caratterizzati dalla capacità di legare IL-11 (preferibilmente dalla stessa specie) e di stimolare la transduzione di segnale in cellule che esprimono IL-11R α e gp130 (come descritto ad es. in Curtis et al., Blood, 1997, 90(11) o in Karpovich et al., Mol. Hum. Reprod., 2003, 9(2): 75-80). Un frammento di un recettore di IL-11 può essere di una qualsiasi lunghezza (per numero di amminoacidi), sebbene opzionalmente possa essere almeno il 25% della lunghezza di IL-11R α maturo ed avere una lunghezza massima di uno di 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% della lunghezza di IL-11R α maturo. Un frammento di un frammento del recettore di IL-11 può avere una lunghezza minima di 10 amminoacidi ed una lunghezza massima di 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120,

130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400 o 415
amminoacidi.

Agente in grado di inibire l'azione di IL-11

Il percorso di segnalazione di IL-11 offre vie multiple per l'inibizione della segnalazione di IL-11. Ad esempio, l'inibizione può essere ottenuta mediante prevenzione o riduzione del legame di IL-11 ad un recettore di IL-11. Come risultato, agenti adatti possono bersagliare o IL-11 o il suo recettore.

In alcune forme di realizzazione, agenti in grado di inibire l'azione di IL-11 possono legarsi a IL-11 e prevenire o ridurre la segnalazione mediata da IL-11, ad es. attraverso un recettore di IL-11. In alcune forme di realizzazione, agenti in grado di inibire l'azione di IL-11 possono legarsi al recettore di IL-11 e prevenire o ridurre la segnalazione stimolata da IL-11.

Agenti che si legano ad IL-11 possono inibire la segnalazione mediata da IL-11 bloccando il legame di IL-11 ad un recettore di IL-11 e/o riducendo la quantità di IL-11 disponibile a legarsi al suo recettore. Agenti di legame di IL-11 adatti possono essere inibitori di IL-11 o antagonisti di IL-11.

Agenti di legame di IL-11, per es. anticorpi anti-IL-11, secondo la presente divulgazione, possono presentare almeno una delle seguenti proprietà:

- a) Legarsi ad IL-11 umana con K_D di 1 μM o meno, preferibilmente di $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 100 \text{ pM}$.
- b) Inibire la segnalazione mediata da IL-11 attraverso il

recettore di IL-11R α , ad es. in un'analisi basata su cellule in cui le cellule co-esprimono IL-11R α e gp130. Analisi basate su cellule adatte sono l'incorporazione di ^3H -timidina e l'analisi di proliferazione di cellule Ba/F3 descritte in Curtis et al., Blood, 1997, 90(11) ed in Karpovich et al., Mol. Hum. Reprod., 2003, 9(2):75-80. Ad esempio, IC₅₀ per un agente di legame di IL-11 può essere determinato coltivando cellule Ba/F3 che esprimono IL-11R α e gp130 in presenza di IL-11 umana e di un agente di legame di IL-11 e misurando l'incorporazione di ^3H -timidina nel DNA. Agenti di legame di IL-11 adatti possono presentare una IC₅₀ di 10 $\mu\text{g/ml}$ o meno, preferibilmente di $\leq 5 \mu\text{g/ml}$, $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, $\leq 3,5 \mu\text{g/ml}$, $\leq 3 \mu\text{g/ml}$, $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0,9 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0,8 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0,7 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0,6 \mu\text{g/ml}$ o $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ in tale analisi.

c) Inibire la proliferazione di fibroblasti, ad es. la proliferazione di fibroblasti cardiaci/atriali. Ciò può, ad esempio, essere valutato in un'analisi in cui i fibroblasti vengono stimolati con IL-11 o con TGF β 1 e la proliferazione delle cellule viene monitorata come qui descritto.

d) Inibire la generazione di miofibroblasti, ad es. da fibroblasti cardiaci/atriali. Questo può essere valutato, ad esempio, in un'analisi in cui i fibroblasti vengono stimolati con IL-11 o con TGF β 1 e la generazione di miofibroblasti viene monitorata, ad es. misurando i livelli di αSMA .

e) Inibire la produzione di matrice extracellulare mediante fibroblasti, ad es. fibroblasti cardiaci/atriali. Ciò può, ad

esempio, essere valutato in un'analisi in cui i fibroblasti vengono stimolati con IL-11 o con TGF β 1 e viene misurata la produzione di componenti di matrice extracellulare.

f) Inibire l'espressione di collagene e/o gene di periostina o proteina periostina in fibroblasti, ad es. fibroblasti cardiaci/atriali. Ciò può essere valutato, ad esempio, in un'analisi in cui i fibroblasti sono stimolati con IL-11 o con TGF β 1 e viene misurata l'espressione di collagene e/o gene o proteina periostina.

Agenti di legame di IL-11 possono essere di qualsiasi tipo, ma in alcune forme di realizzazione, un agente di legame di IL-11 può essere un anticorpo, polipeptide, peptide, oligonucleotide, aptamero o piccola molecola.

Anticorpi anti-IL-11 adatti si legheranno preferibilmente a IL-11 (l'antigene), preferibilmente ad IL-11 umana e possono avere una costante di dissociazione (K_D) di uno di $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 100 \text{ pM}$. L'affinità di legame di un anticorpo per il suo bersaglio è spesso descritto in termini della sua costante di dissociazione (K_D). L'affinità di legame può essere misurata mediante procedimenti noti nel campo, come ad esempio la Risonanza Plasmon di Superficie (SPR) o mediante un'analisi di legame all'antigene radiomarcato (RIA) condotta con la versione Fab dell'anticorpo e molecola di antigene.

Gli anticorpi anti-IL-11 possono essere anticorpi antagonisti che inibiscono o riducono l'attività biologica di IL-11.

Gli anticorpi anti-IL-11 possono essere anticorpi neutralizzanti che neutralizzano l'effetto biologico di IL-11, cioè la loro capacità di stimolare la segnalazione produttiva attraverso un recettore di IL-11.

L'attività di neutralizzazione può essere misurata dalla capacità di neutralizzare la proliferazione indotta da IL-11 nella linea di cellule di plasmacitoma murina T11 (Nordan R.P., et al. (1987), *J. Immunol.*, 139:813).

Esempi di anticorpi anti-IL-11 noti comprendono gli anticorpi monoclonali clone 6D9A, clone KT8 (Abbiotec), clone M3103F11 (BioLegend), clone 1F1, clone 3C6 (Abnova Corporation), clone GF1 (LifeSpan Biosciences), clone 13455 (Source BioScience) e clone 22626 (R&D Systems, usato in Bockhorn et al., *Nat. Commun.* (2013), 4(0): 1393; Monoclonal Mouse IG_{2A}; Catalogo N. MAB218; R&D Systems, MN, USA).

Gli anticorpi possono essere opzionalmente scelti per non presentare sostanzialmente reattività incrociata con uno o più di IL-6, CNTF, LIF, OSM, CLC o CT-1 umani, ad es. umani ricombinanti.

Agenti di legame di IL-11 a base di peptide o polipeptide possono essere basati sul recettore di IL-11, ad es., un frammento di legame di IL-11 di un recettore di IL-11. In una forma di realizzazione, agenti di legame di IL-11 adatti possono comprendere un frammento di legame di IL-11 della catena IL-11R α e possono preferibilmente essere solubili e/o escludere uno o più, o tutti, del dominio (domini) di transmembrana. Tali molecole possono essere

descritte come decoy receptors.

Curtis et al. (Blood, 1 dicembre 1997; 90(11):4403-12) riferiscono una catena alfa di recettore di IL-11R α murina solubile (sIL-11R) in grado di antagonizzare l'attività di IL-11 quando testato su cellule che esprimono IL-11R di membrana e gp130. Hanno proposto che l'antagonismo osservato di IL-11 da parte di sIL-11R dipenda da numeri limitanti di molecole di gp130 su cellule che esprimono già IL-11R di membrana.

L'uso di decoy receptor solubili come base nell'inibizione della trasduzione di segnale e intervento terapeutico è stato anche riportato per altre coppie di molecole di segnalazione:recettore, ad es. VEGF ed il recettore di VEGF (DeChao Yu et al., Molecular Therapy (2012):20 5, 938-947; Konner e Dupont, Clin. Colorectal Cancer, 4 ottobre 2004, suppl. 2:S81-5).

Pertanto, in alcune forme di realizzazione, un agente di legame di IL-11 può essere fornito sotto forma di un recettore decoy o decoy receptor, ad es. un recettore di IL-11 solubile. La competizione per IL-11 fornita da un recettore decoy è stato riportato che porta ad azione antagonista di IL-11 (Curtis et al., sopra).

I recettori di IL-11 decoy legano preferibilmente IL-11 e/o complessi contenenti IL-11 e quindi rendono queste specie non disponibili per il legame a gp130, IL-11R α e/o gp130:recettori di IL-11R α . Pertanto, agiscono come recettori "decoy" o esca per IL-11 e complessi contenenti IL-11, allo stesso modo in cui etanercept agisce come un recettore decoy per TNF α . La segnalazione mediata da IL-11 è

ridotta rispetto al livello di segnalazione in assenza del recettore decoy.

I recettori decoy di IL-11 preferibilmente si legano ad IL-11 attraverso una o più molecole di legame di citochine (CBM). Le CBM sono, o sono derivate da, o sono omologhe a, CBM di molecole di recettore presenti in natura per IL-11. Ad esempio, i recettori decoy di IL-11 possono comprendere o consistere di una o più CBM che sono da, o sono derivate da, o omologhe a, le CBM di gp130 e/o IL-11R α .

In alcune forme di realizzazione, il recettore decoy di IL-11 può comprendere, o consistere di, una sequenza di amminoacidi che corrisponde al modulo di legame di citochina di gp130. In alcune forme di realizzazione, un recettore decoy di IL-11 può comprendere una sequenza di amminoacidi che corrisponde al modulo di legame di citochina di IL-11R α . Qui, una sequenza di amminoacidi che "corrisponde" ad una regione o sequenza di riferimento di un dato peptide/polipeptide ha almeno il 60%, ad es. almeno uno fra il 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità di sequenza con la sequenza di amminoacidi della regione/sequenza di riferimento. I gp130, IL-11R α e IL-11 possono essere da qualsiasi specie e comprendono isoforme, frammenti, varianti o omologhi da qualsiasi specie.

In alcune forme di realizzazione, un recettore decoy può essere in grado di legarsi ad IL-11, ad es. con affinità di legame di almeno 100 μ M o meno, opzionalmente 10 μ M o meno, 1 μ M o meno, 100 nM o meno o circa 1-100 nM. In alcune forme di realizzazione, un recettore

decoy può comprendere tutto o parte del dominio di legame di IL-11 e opzionalmente può mancare di tutto o parte dei domini di transmembrana. Il recettore decoy può opzionalmente essere fuso ad una regione costante di immunoglobulina, ad es. una regione Fc di IgG.

In alcune forme di realizzazione, un agente di legame di IL-11 può essere fornito sotto forma di inibitore a piccola molecola di IL-11, ad es. l'inibitore di IL-11 descritto in Lay et al., Int. J. Oncol. (2012), 41(2):759-764.

Agenti che si legano ad un recettore di IL-11 (IL-11R) possono inibire la segnalazione mediata da IL-11 bloccando il legame da IL-11 ad un IL-11R o prevenendo la transduzione di segnale attraverso co-recettori di gp130. Agenti di legame di legame di IL-11R adatti possono essere inibitori di IL-11R o antagonisti di IL-11R. In forme di realizzazione preferite, il IL-11R è IL-11R α ed agenti di legame adatti possono legare il polipeptide di IL-11R α e possono essere inibitori o antagonisti di IL-11R α .

Agenti di legame di IL-11R, ad es. anticorpi anti-IL-11R, secondo la presente divulgazione, possono presentare almeno una delle seguenti proprietà:

(a) Legarsi a IL-11R umano con una K_D di 1 μ M o meno, preferibilmente di $\leq 1 \mu$ M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM o ≤ 100 pM.

(b) Inibire la segnalazione di IL-11R, ad es. in un'analisi basata su cellule in cui le cellule co-esprimono IL-11R α e gp130. Analisi basate su cellule adatte sono l'incorporazione di 3 H-

timidina e analisi di proliferazione di cellule Ba/F3 descritte, ad es., in Curtis et al., Blood, 1997, 90(11) ed in Karpovich et al., Mol. Hum. Reprod., 2003, 9(2):75-80. Ad esempio, IC₅₀ per un agente di legame di IL-11R può essere determinato coltivando cellule Ba/F3 che esprimono IL-11R α e gp130 in presenza di IL-11 umana e di un agente di legame di IL-11R e misurando l'incorporazione di ³H-timidina nel DNA. Agenti di legame di IL-11R adatti possono presentare una IC₅₀ di 10 μ g/ml o meno, preferibilmente di ≤ 5 μ g/ml, ≤ 4 μ g/ml $\leq 3,5$ μ g/ml, ≤ 3 μ g/ml, ≤ 2 μ g/ml, ≤ 1 μ g/ml, $\leq 0,9$ μ g/ml, $\leq 0,8$ μ g/ml, $\leq 0,7$ μ g/ml, $\leq 0,6$ μ g/ml o $\leq 0,5$ μ g/ml in tale analisi.

(c) Inibire la proliferazione dei fibroblasti, ad es. proliferazione di fibroblasti cardiaci/atriali. Questo può essere valutato, ad esempio, in un'analisi in cui i fibroblasti sono stimolati con IL-11 o TGF β 1 e la proliferazione cellulare è monitorata come qui descritto.

(d) Inibire la generazione di miofibroblasti, ad es. da fibroblasti cardiaci/atriali. Questo può essere valutato, ad esempio, in un'analisi in cui i fibroblasti sono stimolati con IL-11 o TGF β 1 e la generazione di miofibroblasti è monitorata, ad es. misurando i livelli di α SMA.

(e) Inibire la produzione di matrice extracellulare da parte dei fibroblasti, ad es. fibroblasti cardiaci/atriali. Questo può essere valutato, ad esempio, in un'analisi in cui i fibroblasti sono stimolati con IL-11 o TGF β 1 e la produzione di componenti di

matrice extracellulare viene misurata.

(f) Inibire l'espressione di collagene e/o gene di periostina o proteina in fibroblasti, ad es. fibroblasti cardiaci/atriali. Questo può essere valutato, ad esempio, in un'analisi in cui i fibroblasti vengono stimolati con IL-11 o TGF β 1 e viene misurata l'espressione di collagene e/o gene o proteina di periostina.

Gli agenti di legame di IL-11R possono essere di qualsiasi tipo, ma in alcune forme di realizzazione un agente di legame di IL-11R può essere un anticorpo, polipeptide, peptide, oligonucleotide, aptamero o piccola molecola.

Anticorpi anti-IL-11R α adatti si legheranno preferibilmente ad IL-11R (l'antigene), preferibilmente ad IL-11R umano e possono avere una costante di dissociazione (K_D) di $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 100 \text{ pM}$. L'affinità di legame di un anticorpo al suo bersaglio è spesso descritta in termini della sua costante di dissociazione (K_D). L'affinità di legame può essere misurata mediante procedimenti noti nel campo, come ad esempio mediante Risonanza Plasmon di superficie (SPR) o mediante un'analisi di legame di antigene radiomarcato (RIA) compiuta con la versione Fab dell'anticorpo e molecola di antigene.

Gli anticorpi anti-IL-11R possono essere anticorpi antagonisti che inibiscono o riducono l'attività biologica di IL-11R. Anticorpi anti-IL-11R possono essere anticorpi antagonisti che inibiscono o riducono una qualsiasi funzione di, in particolare la segnalazione. Ad esempio, anticorpi IL-11R antagonisti possono inibire o prevenire

il legame di IL-11R a IL-11R, oppure possono inibire o prevenire l'associazione di IL-11R α con gp130 per formare un complesso di recettore funzionale in grado di compiere segnalazione produttiva, ad es. in risposta al legame di IL-11.

Gli anticorpi anti-IL-11R possono essere anticorpi neutralizzanti che neutralizzano l'effetto biologico di IL-11R, ad es. la sua capacità di iniziare la segnalazione produttiva mediata da legame di IL-11.

L'attività di neutralizzazione può essere misurata mediante la capacità di neutralizzare la proliferazione indotta da IL-11 nella linea di cellule di plasmacitoma di topo T11 (Nordan R.P., et al. (1987), J. Immunol., 139:813).

Esempi di anticorpi anti-IL-11R noti comprendono l'anticorpo monoclonale clone 025 (Sino Biological), clone EPR5446 (Abcam), clone 473143 (R&D Systems), clone 8E2 e 8E4 descritti in US 2014/0219919 A1 e gli anticorpi monoclonali descritti in Blanc et al. (J. Immunol. Methods, 31 luglio 2000; 241(1-2); 43-59).

Agenti di legame di IL-11R basati su peptide o polipeptide possono essere basati su IL-11, ad es. mutante, variante o frammento di legame di IL-11. Agenti adatti basati su peptide o polipeptide possono legarsi a IL-11R in un modo che non porta ad inizio di transduzione di segnale né produce segnalazione sub-ottimale. Mutanti di IL-11 di questo tipo possono agire come inibitori competitivi di IL-11 endogena.

Ad esempio, W147A è un antagonista di IL-11 in cui l'amminoacido

147 è mutato da un triptofano in alanina, che distrugge il cosiddetto "sito III" di IL-11. Questo mutante può legarsi a IL-11R, ma l'impegno dell'omodimero gp130 fallisce, con il risultato di efficiente bloccaggio della segnalazione di IL-11 (Underhill-Day et al., 2003; *Endocrinology*, agosto 2003, 144(8):3406-14). Lee et al. (*Am. J. Respir Cell Mol. Biol.*, dicembre 2008; 39(6):739-746) riferiscono anche la generazione di un mutante antagonista di IL-11 (una muteina) in grado di inibire specificatamente il legame di IL-11 a IL-11R α .

Menkhorst et al. (*Biology of Reproduction*, 1 maggio 2009, vol. 80, n. 5, 920-927) descrivono un antagonista di IL-11 PEGilato, PEGIL11A (CSL Limited, Parkvill, Victoria, Australia) che è efficace per inibire l'azione di IL-11 in topi femmina.

Pasqualini et al., *Cancer* (2015), 121(14):2411-2421 descrivono un farmaco peptidomimetico diretto a ligando, peptidomimetico 11 di bersagliamento di metastasi ossea (BMTP-11) in grado di legarsi a IL-11R α .

In alcune forme di realizzazione, un agente di legame di IL-11R può essere fornito sotto forma di un inibitore a piccola molecola di IL-11R.

Gli inventori hanno identificato che la sovra-regolazione della espressione di IL-11 è coerente con il meccanismo molecolare della fibrosi e che l'inibizione dell'attività di IL-11 porta a riduzione della base molecolare per la fibrosi. Di conseguenza, in alcuni aspetti del trattamento della presente divulgazione, la prevenzione o

alleviamento della fibrosi può essere fornita mediante la somministrazione di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 da parte delle cellule del soggetto, ad es. da parte di fibroblasti o miofibroblasti.

Agenti adatti possono essere di qualsiasi tipo, ma in alcune forme di realizzazione, un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 può essere una piccola molecola o un oligonucleotide.

Taki et al. (Clin. Exp. Immunol., aprile 1998; 112(1):133-138) riferiscono una riduzione nell'espressione di IL-11 in cellule sinoviali reumatoidi in seguito a trattamento con indometacina, dexametasone o interferone gamma (IFN γ).

In alcune forme di realizzazione, un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 può essere un oligonucleotide in grado di reprimere o silenziare l'espressione di IL-11.

Di conseguenza, la presente divulgazione comprende anche l'uso di tecniche note nel campo per la sotto-regolazione terapeutica dell'espressione di IL-11. Questi comprendono l'uso di oligonucleotidi antisenso e interferenza di RNA (RNAi). Come in altri aspetti della presente divulgazione, queste tecniche possono essere usate nel trattamento della fibrosi.

Di conseguenza, la presente invenzione fornisce un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi, il metodo comprendendo somministrare ad un soggetto che necessita del trattamento, una

quantità terapeuticamente efficace di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11, in cui l'agente comprende un vettore che comprende un oligonucleotide terapeutico in grado di reprimere o silenziare l'espressione di IL-11.

Si divulga qui anche un metodo per il trattamento o prevenzione della fibrosi, il metodo comprendendo somministrare ad un soggetto che necessita del trattamento, una quantità terapeuticamente efficace di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11, in cui l'agente comprende un vettore di oligonucleotidi, opzionalmente un vettore virale, che codifica un oligonucleotide terapeutico in grado di essere espresso nelle cellule del soggetto, l'oligonucleotide terapeutico espresso essendo in grado di reprimere o silenziare l'espressione di IL-11.

La capacità di un agente di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 può essere analizzata determinando la capacità dell'agente di inibire l'espressione del gene o proteina IL-11 da parte di fibroblasti o miofibroblasti, ad es. fibroblasti i miofibroblasti cardiaci/atriali. Questo può essere valutato, ad esempio, in un'analisi in cui i fibroblasti o i miofibroblasti vengono stimolati con IL-11 o TGF β 1 e viene misurata l'espressione del gene o proteina di IL-11.

Ridurre la quantità di IL-11R disponibile per il legame a IL-11 ed iniziare la segnalazione produttiva fornisce un mezzo alternativo per ridurre i livelli di segnalazione stimolata da IL-11. Di conseguenza, in aspetti correlati qui descritti, il trattamento,

prevenendo o alleviamento della fibrosi possono essere forniti mediante la somministrazione di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11R da parte delle cellule del soggetto, ad es. da parte di fibroblasti o miofibroblasti.

In alcune forme di realizzazione, un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11R può essere un oligonucleotide in grado di reprimere o silenziare l'espressione di IL-11R.

Di conseguenza, la presente divulgazione comprende anche l'uso di tecniche note nel campo per la sotto-regolazione terapeutica dell'espressione di IL-11R. (Z) Questi comprendono l'uso di oligonucleotidi antisense e interferenza di RNA (RNAi). Come in altri aspetti della presente divulgazione, queste tecniche possono essere usate nel trattamento della fibrosi.

Di conseguenza, la presente divulgazione fornisce un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi, il metodo comprendendo somministrare ad un soggetto che necessita del trattamento, una quantità terapeuticamente efficace di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11R, in cui l'agente comprende un vettore che comprende un oligonucleotide terapeutico in grado di reprimere o silenziare l'espressione di IL-11R.

La presente divulgazione fornisce anche un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi, il metodo comprendendo somministrare ad un soggetto che necessita del trattamento, una quantità terapeuticamente efficace di un agente in grado di prevenire

o ridurre l'espressione di IL-11R, in cui l'agente comprende un vettore di oligonucleotidi, opzionalmente un vettore virale, che codifica un oligonucleotide terapeutico in grado di essere espresso nelle cellule del soggetto, l'oligonucleotide terapeutico espresso essendo in grado di reprimere o silenziare l'espressione di IL-11R.

La capacità di un agente di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11R può essere analizzata determinando la capacità dell'agente di inibire l'espressione del gene o proteina IL-11R da parte di fibroblasti o miofibroblasti, ad es. fibroblasti e miofibroblasti cardiaci/atriali. Questo può essere valutato, ad esempio, in un'analisi in cui i fibroblasti o i miofibroblasti vengono stimolati con IL-11 o TGF β 1 e viene misurata l'espressione del gene o proteina di IL-11R.

In forme di realizzazione preferite, IL-11R può essere IL-11R α .

Anticorpi

Nel presente testo "anticorpo" comprende un frammento o derivato di un anticorpo, o un anticorpo sintetico o frammento di anticorpo sintetico.

Gli anticorpi possono essere forniti in forma isolata o purificata. Gli anticorpi possono essere formulati come una composizione farmaceutica o medicinale.

Alla luce delle tecniche odierne in relazione alla tecnologia degli anticorpi monoclonali, gli anticorpi possono essere preparati per la maggior parte degli antigeni. La porzione di legame all'antigene può far parte di un anticorpo (ad esempio un frammento

Fab) o un frammento di anticorpo sintetico (ad esempio un frammento Fv a catena singola [ScFv]). Anticorpi monoclonali adatti per selezionare gli antigeni possono essere preparati mediante tecniche note, ad esempio quelli descritte in "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H. Zola (CRC Press, 1988) ed in "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J.G.R. Hurrell (CRC Press, 1982). Gli anticorpi chimerici sono discussi da Neuberger et al. (1988, 8° Simposio di Biotecnologia Internazionale, Parte 2, 792-799).

Gli anticorpi monoclonali (mAb) sono utili nei metodi dell'invenzione e sono una popolazione omogenea di anticorpi che bersagliano specificatamente un singolo epitopo sull'antigene.

Gli anticorpi policlonali sono utili nei metodi della invenzione. Sono preferiti anticorpi policlonali monospecifici. Anticorpi policlonali adatti possono essere preparati utilizzando procedimenti ben noti nel campo.

Frammenti di legame all'antigene di anticorpi, come frammenti Fab e Fab₂ possono pure essere usati/forniti come pure anticorpi e frammenti di anticorpi ingegnerizzati geneticamente. I domini pesante variabile (V_H) e leggero variabile (V_L) dell'anticorpo sono implicati nel riconoscimento dell'antigene, un fatto riconosciuto per la prima volta dagli iniziali esperimenti di digestione con proteasi. Ulteriore conferma è stata trovata dalla "umanizzazione" di anticorpi di roditori. I domini variabili di origine da roditori possono essere fusi a domini costanti di origine umana in modo tale che l'anticorpo

risultante conservi la specificità antigenica dell'anticorpo parentato di roditore (Morrison et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855).

La specificità antigenica viene conferita dai domini variabili ed è indipendente dai domini costanti ed è noto da esperimenti che implicano l'espressione batterica di frammenti di anticorpo, che contengono tutti uno o più domini variabili. Quelle molecole comprendono molecole Fab-simili (Better et al. (1988), Science, 240, 1041); molecole Fv (Skerra et al. (1988), Science, 240, 1038); molecole Fv a singola catena (ScFv) dove i domini di partner V_H e V_L sono collegati attraverso un oligopeptide flessibile (Bird et al. (1988), Science, 242, 423; Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85, 5879) ed anticorpi a singolo dominio (dAb) comprendenti domini V isolati (Ward et al. (1989), Nature, 341, 544). Una rassegna generale delle tecniche implicate nella sintesi di frammenti di anticorpi che conservano i loro siti di legame specifici si trova in Winter & Milstein (1991), Nature, 349, 293-299.

Con "molecole ScFv" intendiamo molecole in cui i domini di partner V_H e V_L sono legati covalentemente, ad es. mediante un oligopeptide flessibile.

Frammenti di anticorpi Fab, Fv, ScFv e dAb possono essere tutti espressi e secreti da E. coli, consentendo così una produzione facile di grosse quantità di detti frammenti.

Anticorpi interi e frammenti $F(ab')_2$ sono "bivalenti". Con "bivalenti" intendiamo che detti anticorpi e frammenti $F(ab')_2$ hanno

due siti di combinazione all'antigene. Al contrario, frammenti Fab, Fv, ScFv e dAb sono monovalenti, avendo un unico sito di combinazione all'antigene. Gli anticorpi sintetici che si legano a IL-11 o a IL-11R possono pure essere realizzati utilizzando la tecnologia di display fagico come è ben noto nel campo.

Gli anticorpi possono essere prodotti mediante un processo di maturazione ad affinità in cui viene generato un anticorpo modificato che ha un miglioramento nell'affinità dell'anticorpo per l'antigene, rispetto ad un anticorpo parentale non modificato. Anticorpi maturati ad affinità possono essere prodotti mediante procedure note nel campo, ad es., Marks et al., *Rio/Technology*, 10:779-783 (1992); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7):3310-3319 (1995); e Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

Gli anticorpi secondo la presente divulgazione presentano preferibilmente legame specifico per IL-11 o IL-11R. Un anticorpo che si lega specificatamente ad una molecola bersaglio preferibilmente si lega al bersaglio con maggiore affinità e/o con maggiore durata rispetto a quando si lega con altri bersagli. In una forma di realizzazione, la misura di legame di un anticorpo al suo bersaglio non correlato è minore di circa il 10% del legame dell'anticorpo al bersaglio come misurato, ad es., mediante ELISA o mediante analisi radioimmunologica (RIA). In alternativa, la specificità di legame può essere riflessa in termini di affinità di legame ove l'anticorpo si

lega a IL-11 o a IL-11R con una K_D che è almeno di $0,1$ ordine di grandezza (cioè $0,1 \times 10^n$, dove n è un numero intero che rappresenta l'ordine di grandezza) maggiore della K_D dell'anticorpo verso un'altra molecola bersaglio, ad es. un altro membro della famiglia di IL-11 come IL-6 o il recettore di IL-6. Questo può essere opzionalmente almeno uno di $0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5$ o $2,0$.

Gli anticorpi possono essere marcati in modo rivelabile o, almeno, in grado di essere rivelati. Tali anticorpi essendo utili sia per applicazioni *in vivo* (ad es., in procedimenti di imaging o acquisizione di immagini) ed *in vitro* (ad es., in procedimenti di analisi). Ad esempio, l'anticorpo può essere marcato con un atomo radioattivo o molecola colorata o molecola fluorescente oppure una molecola che possa essere facilmente rivelata in un qualsiasi altro modo. Molecole rivelabili adatte comprendono proteine fluorescenti, luciferasi, substrati enzimatici e radiomarcatori. La frazione di legame può essere marcata direttamente con un marcatore rivelabile oppure può essere marcata in modo indiretto. Ad esempio, la frazione di legame può essere un anticorpo non marcato che può essere rivelato mediante un altro anticorpo che è esso stesso marcato. In alternativa, il secondo anticorpo può avere legato ad esso biotina ed il legame di streptavidina marcata alla biotina viene utilizzato per marcare in modo indiretto il primo anticorpo.

Aspetti della presente divulgazione comprendono anticorpi bispecifici, composti ad es. da due diversi frammenti di due diversi

anticorpi, in modo tale che l'anticorpo bispecifico si legghi a due tipi di antigene. Uno degli antigeni è IL-11 o IL-11R, l'anticorpo bispecifico comprendente un frammento come qui descritto, che si lega a IL-11 o a IL-11R. L'anticorpo può contenere un diverso frammento avente affinità per un secondo antigene che può essere un qualsiasi antigene desiderato. Tecniche per la preparazione di anticorpi bispecifici sono ben note nel campo, si veda ad es. Mueller D., et al. (2010, *Biodrugs*, 24(2):89-98), Wozniak-Knopp G., et al. (2010, *Protein Eng. Des.*, 23(4):829-297. Baeuerle P.A., et al. (2009, *Cancer Res.*, 69(12):4941-4944).

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo bispecifico viene fornito come una proteina di fusione di formato di due frammenti variabili a catena singola (scFV), comprendente una V_H e V_L di un anticorpo di legame a IL-11 o IL-11R o frammento di anticorpo ed una V_H ed una V_L di un altro anticorpo o frammento di anticorpo.

Anticorpi bispecifici e frammenti di legame di antigeni bispecifici possono essere forniti in qualsiasi formato adatto, come ad esempio quei formati descritti in Kontermann *MAbs* 2012, 4(2):182-197. Ad esempio, un anticorpo bispecifico o frammento di legame all'antigene bispecifico può essere un coniugato di anticorpo bispecifico (ad es. una IgG₂, F(ab')₂ o CovX-Body), una molecola di IgG o di IgG-simile bispecifica (ad es., IgG, scFv₄-Ig, IgG-scFv-IgG, DVD-Ig, IgG-sVD, sVD-IgG, 2 in 1-IgG, mAb² o Tandemab common LC), una molecola IgG o IgG-simile bispecifica asimmetrica (ad es. una kih IgG, kih IgG common LC, cross-mAb, kih IgG-scFab, mAb-Fv, coppia di

carica o SEED-body), una piccola molecola di anticorpo bispecifica (ad es. un diacorpo (Db), dsDb, DART, scDb, tandAb, scFv tandem (taFv), dAb tandem/VHH, triplo corpo, tripla testa, Fab-scFv o $F(ab')_2$ -scFv₂), un Fc bispecifico ed una proteina di fusione C_H3 (ad es., taFv-Fc, Di-diacorpo, scDb-C_H3, scFv-Fc-scFv, HCAb-VHH, scFv-kih-Fc o scFv-kih-C_H3) o una proteina di fusione bispecifica (ad es. una scFv₂-albumina, scDb-albumina, taFv-tossina, DNL-Fab₁, DNL-Fab₄-IgG, DNL-Fab₄-IgG-citochina). Si veda in particolare la Figura 2 di Kontermann, *MAbs*, 2012, 4(2):182-19.

Procedimenti per produrre anticorpi bispecifici comprendono reticolare anticorpi o frammenti di anticorpi, ad es. con legami disolfuro riducibili oppure legami tioetere non riducibili, ad esempio come descritto in Segal e Bast, 2001, *Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology*, 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16. Per esempio, N-succinimidil-3-(2-piridiltio)-propionato (SPDP) può essere utilizzato per reticolare chimicamente, ad es., frammenti di Fab attraverso gruppi SH di regione di cerniera per creare eterodimeri $F(ab)_2$ bispecifici legati con disolfuro.

Altri procedimenti per produrre anticorpi bispecifici comprendono fondere ibridomi di produzione di anticorpi, ad es. con polietilen glicole, per produrre una cellula di quadroma in grado di secernere un anticorpo bispecifico, ad esempio come descritto in D.M. e Bast B.J., 2001, *Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology*. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16.

Gli anticorpi bispecifici e frammenti di legame all'antigene

bispecifici possono anche essere prodotti in modo ricombinante, ad es. mediante espressione da un costrutto di acido nucleico che codifica polipeptidi per le molecole di legame all'antigene, ad esempio come descritto in *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, seconda edizione (Humana Press, 2012), capitolo 40: *Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv* (Horning e Faber-Schwarz) or French. *How to make bispecific antibodies*, *Methods Mol. Med.*, 2000;40:333-339.

Ad esempio, un costrutto di DNA che codifica domini variabili di catena leggera e pesante per i due domini di legame all'antigene (cioè i domini variabili di catena leggera e pesante per il dominio di legame all'antigene in grado di legare IL-11 o IL-11R ed i domini variabili di catena leggera e catena pesante per il dominio di legame all'antigene in grado di legarsi ad un'altra proteina bersaglio) e comprende sequenze che codificano un linker adatto o un dominio di dimerizzazione fra i domini di legame all'antigene possono essere preparati mediante tecniche di clonazione molecolare. L'anticorpo bispecifico ricombinante nel seguito può essere prodotto mediante espressione (ad es. *in vitro*) del costrutto in una cellula ospite adatta (ad es. una cellula ospite di mammifero) e l'anticorpo bispecifico ricombinante espresso può quindi essere opzionalmente purificato.

Aptameri

Gli aptameri, chiamati anche ligandi di acidi nucleici, sono molecole di acido nucleico caratterizzate dalla capacità di legarsi

ad una molecola bersaglio con alta specificità ed alta affinità. Quasi ogni aptamero identificato finora è una molecola non presente in natura.

Gli aptameri per un dato bersaglio (ad es. IL-11 o IL-11R) possono essere identificati e/o prodotti mediante il procedimento di Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX™). Gli aptameri e SELEX sono descritti in Tuerk e Gold (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science. 3 agosto 1990; 249(4968): 505-10) ed in WO 91/19813.

Gli aptameri possono essere molecole di DNA o RNA e possono essere a filamento singolo o a filamento doppio. L'aptamero può comprendere acidi nucleici chimicamente modificati, ad esempio in cui lo zucchero e/o fosfato e/o una base è modificato chimicamente. Tali modifiche possono migliorare la stabilità dell'aptamero o rendere l'aptamero più resistente al degrado e possono includere modifiche in corrispondenza della posizione 2' del ribosio.

Gli aptameri possono essere sintetizzati mediante procedimenti che sono ben noti agli esperti del ramo. Ad esempio, gli aptameri possono essere sintetizzati chimicamente, ad es. su un supporto solido.

Sintesi in fase solida può utilizzare la chimica di fosforamidite. In breve, un nucleotide supportato in modo solido viene detritilato, quindi accoppiato ad una fosforamidite nucleoside attivato opportunamente per formare un legame di fosfito triestere.

L'incappucciamento o capping può quindi avvenire, seguito da ossidazione del fosfito triestere con un ossidante, tipicamente iodio. Il ciclo può quindi essere ripetuto per assemblare l'aptamero.

Gli aptameri possono essere pensati come equivalenti dell'acido nucleico degli anticorpi monoclonali ed hanno spesso valori K_d nell'intervallo di nM o pM, per es. meno di 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM. Come con gli anticorpi monoclonali, possono essere utili virtualmente in qualsiasi situazione in cui sia necessario il legame al bersaglio, compreso l'uso in applicazioni terapeutiche e diagnostiche, *in vitro* o *in vivo*. In applicazioni diagnostiche *in vitro*, si può includere l'uso della rivelazione di presenza o assenza di una molecola bersaglio.

Gli aptameri secondo la presente divulgazione possono essere forniti in forma purificata o isolata. Gli aptameri secondo la presente divulgazione possono essere formulati come composizione farmaceutica o medicinale.

Aptameri adatti possono opzionalmente avere una lunghezza minima di 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleotidi.

Aptameri adatti possono opzionalmente avere una lunghezza massima di 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o 80 nucleotidi.

Aptameri adatti possono opzionalmente avere una lunghezza di 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o 80 nucleotidi.

Repressione di oligonucleotidi dell'espressione di IL-11 o di IL-11R

Molecole di oligonucleotidi, in particolare RNA, possono essere impiegate per regolare l'espressione genica. Queste comprendono oligonucleotidi antisenso, degrado mirato o bersagliato di mRNA da parte di piccoli RNA di interferenza (siRNA), silenziamento genico post-trascrizionale (PTG) repressione di traduzione sequenza-specifica regolata per sviluppo di mRNA da parte di microRNA (mirna) e silenziamento genico trascrizionale bersagliato o mirato.

Un oligonucleotide antisenso è un oligonucleotide, preferibilmente a filamento singolo, che bersaglia e si lega, mediante legame di sequenza complementare, ad un oligonucleotide bersaglio, ad es. mRNA. Quando l'oligonucleotide bersaglio è mRNA, il legame dell'antisenso a mRNA blocca la traduzione dell'mRNA e l'espressione del prodotto genico. Oligonucleotidi antisenso possono essere progettati per legarsi ad acido nucleico genomico senso ed inibire la trascrizione di una sequenza nucleotidica bersaglio.

Alla luce delle sequenze di acido nucleico note per IL-11 (ad es. sequenze di mRNA note disponibili da GenBank® con i numeri di accessione BC012506.1 GI:15341754 (umana), BC134354.1 GI:126632002

(murina), AF347935.1 GI:13549072 (di ratto)) ed IL-11R (ad es. sequenze di mRNA note disponibili da GenBank® con i numeri di accessione NM_001142784.2 GI:391353394 (umana), NM_00116340.1 GI:254281268 (murina), NM_139116.1 GI:20806172 (di ratto)), gli oligonucleotidi possono essere designati per reprimere o silenziare l'espressione di IL-11 o di IL-11R. Tali oligonucleotidi possono avere una qualsiasi lunghezza, ma sono preferibilmente corti, ad es. meno di 100 nucleotidi, ad es. 10-40 nucleotidi o 20-50 nucleotidi e possono comprendere una sequenza di nucleotidi avente complementarità completa o quasi completa (ad es., 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, di complementarità) con una sequenza di nucleotidi di lunghezza corrispondente nell'oligonucleotide bersaglio, ad es. mRNA di IL-11 o di IL-11R. La regione di complementarità della sequenza di nucleotidi può avere una qualsiasi lunghezza, ma è preferibilmente di almeno 5 e opzionalmente non più di 50 nucleotidi di lunghezza, ad es. 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleotidi.

La repressione dell'espressione di IL-11 o IL-11R preferibilmente darà come risultato una diminuzione della quantità di IL-11 o IL-11R espressa da una cellula, ad es. da un fibroblasto o miofibroblasto. Ad esempio, in una data cellula, la repressione di IL-11 o IL-11R mediante somministrazione di un acido nucleico adatto darà come risultato diminuzione della quantità di IL-11 o IL-11R espressa da

quella cellula rispetto alla cellula non trattata. La repressione può essere parziale. Gradi preferiti di repressione sono almeno il 50%, più preferibilmente almeno il 60%, 70%, 80%, 85% o 90%. Un livello di repressione fra il 90% ed il 100% è considerato un "silenziamento" dell'espressione o funzione.

È stato dimostrato un ruolo per il macchinario di RNAi e piccoli RNA nel bersagliamento di complessi di eterocromatina e silenziamento genico epigenetico in corrispondenza di specifici loci cromosomiali. Silenziamento post-traduzionale dipendente da RNA a doppio filamento (dsRNA), noto anche come interferenza di RNA (RNAi) è un fenomeno in cui i complessi di dsRNA possono bersagliare geni specifici di omologia per il silenziamento in un breve periodo di tempo. Questo agisce come segnale per promuovere la degradazione dell'mRNA con identità di sequenza. Un siRNA da 20 nt è generazione sufficientemente lungo da indurre silenziamento gene-specifico, ma abbastanza breve da evadere la risposta dell'ospite. La diminuzione di espressione di prodotti genici bersagliati può essere estesa con il 90% di silenziamento indotto da poche molecole siRNA. Agenti terapeutici basati su RNAi sono progrediti in prove cliniche in fase I, II e III per una pluralità di indicazioni (Nature, 22 gennaio 2009:457(7228):426-433).

Nel campo, tali sequenze di RNA sono denominate "RNA di interferenza corti o piccoli" (siRNA) o "microRNA" (miRNA) in base alla loro origine. Entrambi i tipi di sequenza possono essere utilizzati per sotto-regolare l'espressione genica legandosi a RNA

complementari e o innescando eliminazione di mRNA (RNAi) o arrestando la traduzione di mRNA in proteina. siRNA sono derivati dal trattamento di RNA a doppio filamento lunghi e quando trovati in natura sono tipicamente di origine esogena. Micro-RNA di interferenza (miRNA) sono piccoli RNA non di codifica codificati in modo endogeno, derivati dal trattamento di hairpin o forcine corte. Sia siRNA che miRNA possono inibire la traduzione di mRNA che porta sequenze bersaglio parzialmente complementari senza scissione di RNA e degradano mRNA che portano sequenze completamente complementari.

Di conseguenza, la presente divulgazione fornisce l'uso di sequenze di oligonucleotidi per la sotto-regolazione dell'espressione di IL-11 o IL-11R.

Ligandi di siRNA sono tipicamente a doppio filamento e, al fine di ottimizzare l'efficace della sotto-regolazione mediata da RNA della funzione di un gene bersaglio, si preferisce che la lunghezza della molecola siRNA venga scelta in modo da garantire riconoscimento corretto di siRNA da parte del complesso RISC che media il riconoscimento da parte di siRNA dell'mRNA bersaglio ed in modo tale che siRNA sia sufficientemente corto da ridurre la risposta dell'ospite.

Ligandi di miRNA sono tipicamente a filamento singolo ed hanno regioni che sono parzialmente complementari, il che consente che i ligandi formino un hairpin o forcina. miRNA sono geni di RNA che vengono trascritti dal DNA, ma non vengono tradotti in una proteina. Una sequenza di DNA che codifica un gene di miRNA è più lungo di

miRNA. Questa sequenza di DNA comprende la sequenza di miRNA ed un complemento inverso approssimativo. Quando questa sequenza di DNA è trascritta in una molecola di RNA a filamento singolo, la sequenza di miRNA e la sua paia di basi a complemento inverso formano un segmento di RNA parzialmente a doppio filamento. La progettazione di sequenze di microRNA è discussa in John et al., PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004.

Tipicamente, i ligandi di RNA volti a mimare gli effetti di siRNA o miRNA hanno fra 10 e 40 ribonucleotidi (o loro analoghi sintetici), più preferibilmente fra 17 e 30 ribonucleotidi, più preferibilmente fra 19 e 25 ribonucleotidi e maggiormente preferibilmente fra 21 e 23 ribonucleotidi. In alcune forme di realizzazione della divulgazione che impiegano siRNA a doppio filamento, la molecola può avere overhang 3' o sporgenze simmetriche, ad es. di uno o due (ribo)nucleotidi, tipicamente un UU di un overhang 3' dTdT. Sulla base della divulgazione qui fornita, l'esperto del ramo può facilmente progettare sequenze adatte di siRNA e di miRNA, ad esempio utilizzando risorse come Ambion siRNA finder. Sequenze di siRNA e miRNA possono essere prodotte sinteticamente ed aggiunte in modo esogeno per provocare la sotto-regolazione di geni oppure essere prodotte utilizzando sistemi di espressione (ad es. vettori). In una forma di realizzazione preferita, il siRNA viene sintetizzato in modo sintetico.

RNA a doppio filamento lunghi possono essere lavorati nella cellula per produrre siRNA (si veda ad esempio Myers (2003), Nature

Biotechnology, 21:324-328). Molecole di dsRNA più lunghe possono avere overhang 3' o 5' simmetrici, ad es. uno o due (ribo)nucleotidi oppure possono avere estremità smusse. Molecole di dsRNA più lunghe possono essere di 25 nucleotidi o più. Preferibilmente, le molecole di dsRNA più lunghe sono fra 25 e 30 nucleotidi di lunghezza. Più preferibilmente, le molecole di dsRNA più lunghe sono fra 25 e 27 nucleotidi di lunghezza. Maggiormente preferibilmente, le molecole di dsRNA più lunghe sono di 27 nucleotidi di lunghezza. -dsRNA con 30 nucleotidi o più di lunghezza possono essere espressi utilizzando il pDECAP di vettore (Shinagawa et al., Genes and Dev., 17, 1340-5, 2003).

Un'altra alternativa è l'espressione di una molecola di RNA a forcina corta (shRNA) nella cellula. shRNA sono più stabili rispetto a siRNA sintetici. Una shRNA consiste di brevi ripetizioni invertite separate da una piccola sequenza di loop. Una ripetizione invertita è complementare al bersaglio genico. Nella cellula, l'shRNA viene lavorato o trattato da DICER in un siRNA che degrada l'mRNA del gene bersaglio e sopprime l'espressione. In una forma di realizzazione preferita, shRNA viene prodotto in modo endogeno (all'interno di una cellula) mediante trascrizione da un vettore. shRNA possono essere prodotti all'interno di una cellula mediante transfezione della cellula con un vettore che codifica la sequenza di shRNA sotto il controllo di un promotore di RNA polimerasi III come un promotore umano H1 o 7SK o promotore di una RNA polimerasi II. In alternativa, l'shRNA può essere sintetizzato in modo esogeno (*in vitro*) mediante

trascrizione da un vettore. L'shRNA può quindi essere introdotto direttamente nella cellula. Preferibilmente, la molecola di shRNA comprende una sequenza parziale di IL-11 o IL-11R. Preferibilmente, la sequenza di shRNA è fra 40 e 100 basi di lunghezza, più preferibilmente fra 40 e 70 basi di lunghezza. Lo stelo della forcina è preferibilmente fra 19 e 30 paia di basi di lunghezza. Lo stelo può contenere appaiamenti G-U per stabilizzare la struttura della forcina.

Molecole di siRNA, molecole di dsRNA più lunghe o molecole di miRNA possono essere prodotte in modo ricombinante mediante trascrizione di una sequenza di acido nucleico, preferibilmente contenuta all'interno di un vettore. Preferibilmente, la molecola di siRNA, la molecola di dsRNA più lunga o la molecola di miRNA comprendono una sequenza parziale di IL-11 o di IL-11R.

In una forma di realizzazione, siRNA, dsRNA più lungo o miRNA viene prodotto in modo endogeno (all'interno di una cellula) mediante trascrizione da un vettore. Il vettore può essere introdotto nella cellula in qualsiasi dei modi noti nel campo. Opzionalmente, l'espressione della sequenza di RNA può essere regolata utilizzando un promotore specifico per il tessuto (ad es. specifico per cuore, fegato, rene o occhio). In un'ulteriore forma di realizzazione, siRNA, dsRNA più lungo o miRNA viene prodotto in modo esogeno (*in vitro*) mediante trascrizione da un vettore.

Vettori adatti possono essere vettori di oligonucleotidi configurati per esprimere l'agente di oligonucleotide in grado di

compiere repressione di IL-11 o di IL-11R. Tali vettori possono essere vettori virali o vettori plasmidici. L'oligonucleotide terapeutico può essere incorporato nel genoma di un vettore virale ed operativamente legato ad una sequenza regolatoria, ad es. promotore, che guida la sua espressione. Il termine "operativamente legato" può includere la situazione in cui una sequenza di nucleotidi scelta ed una sequenza di nucleotidi regolatoria sono legate in modo covalente in modo tale da porre l'espressione di una sequenza di nucleotidi sotto l'influenza o il controllo della sequenza regolatoria. Pertanto, una sequenza regolatoria è operativamente legata ad una sequenza nucleotidica scelta se la sequenza regolatoria è in grado di effettuare la trascrizione di una sequenza nucleotidica che fa parte di o tutta la sequenza nucleotidica scelta.

Vettori di virus che codificano sequenze di siRNA espresse dal promotore sono note nel campo ed hanno il beneficio dell'espressione a lungo termine dell'oligonucleotide terapeutico. Esempi comprendono vettori lentivirali (Nature, 22 gennaio 2009; 457(7228):426-433), adenovirus (Shen et al., FEBS Lett., 27 marzo 2003; 539(1-3):111-4) e retrovirus (Barton e Medzhitov, PNAS, 12 novembre 2002, vol. 99, n. 23, 14943-14945).

In altre forme di realizzazione, un vettore può essere configurato per assistere nell'erogazione dell'oligonucleotide terapeutico al sito al quale è necessaria la repressione della espressione di IL-11 o IL-11R. Tali vettori tipicamente comprendono complessamento dell'oligonucleotide con un vettore a carica positiva

(per es., peptidi di penetrazione di cellule cationici, polimeri e dendrimeri cationici e lipidi cationici); coniugare l'oligonucleotide con una molecola piccola (ad es. colesterolo, acidi biliari e lipidi), polimeri, anticorpi e mRNA; o incapsulare l'oligonucleotide in formulazioni di nanoparticelle (Wang et al., AAPS J., dicembre 2010; 12(4):492-503).

In una forma di realizzazione, un vettore può comprendere una sequenza di acido nucleico in orientamento sia di senso che antisenso, in modo tale che quando espresso come RNA, le sezioni senso ed antisenso si associano per formare un RNA a doppio filamento.

In alternativa, molecole di siRNA possono essere sintetizzate utilizzando tecniche di sintesi in fase solida o in soluzione standard, come è noto nel campo. Collegamenti fra nucleotidi possono essere legami fosfodiesterici o alternative comprendono, ad esempio, gruppi di legame di formula $P(O)S$, (tioato); $P(S)S$, (ditioato); $P(O)NR'_2$; $P(O)R'$; $P(O)OR_6$; CO ; o $CONR'_2$ in cui R e H (o un sale) o alchile (1-12C) e R_6 è alchile (1-9C) è unito ad intermedi adiacenti attraverso -O- o -S-,

Basi nucleotidiche modificate possono essere usate in aggiunta alle basi presenti in natura e possono conferire proprietà vantaggiose alle molecole di siRNA che le contengono.

Ad esempio, basi modificate possono aumentare la stabilità della molecola di siRNA, così da ridurre la quantità richiesta per il silenziamento. La fornitura di basi modificate può anche fornire

molecole di siRNA che sono più stabili o meno stabili di siRNA non modificato.

Il termine "base nucleotidica modificata" comprende nucleotidi con una base e/o zucchero modificata in modo covalente. Ad esempio, i nucleotidi modificati comprendono nucleotidi aventi zuccheri che sono attaccati in modo covalente a gruppi organici a basso peso molecolare diversi da un gruppo ossidrile in posizione 3' e diversi da un gruppo fosfato in posizione 5'. I nucleotidi così modificati possono anche includere zuccheri 2' sostituiti come 2'-O-metil-; 2'-O-alchile; 2'-O-allile; 2'-S-alchile; 2'-S-allile; 2'-fluoro-; 2'-alo o azido-ribosio, analoghi dello zucchero carbociclici; zuccheri α -anomerici; zuccheri epimerici come arabinosio, xilosio o lixosio, zuccheri piranosio, zuccheri furanosio e sedoeptulosio.

Nucleotidi modificati sono noti nel campo e comprendono purine e pirimidine alchilate, purine e pirimidine acilate ed altri eterocicli. Queste classi di pirimidine e purine sono ben note nel campo e comprendono pseudoisocitosina, N4,N4-etanocitosina, 8-idrossi-N6-metiladenina, 4-acetilcitosina, 5-(carbossiidrossilmetil)uracile, 5-fluorouracile, 5-bromouracile, 5-carbossimetilamminometil-2-tiouracile, 5-carbossimetilamminometil uracile, diidrouracile, inosina, N6-isopentil-adenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracile, 1-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilamminometil uracile, 5-metossi ammino metil-2-tiouracile, D-mannosilqueosina, 5-metossicarbonilmetiluracile, 5-metossiuracile, 2-

metiltio-N6-isopenteniladenina, metil estere dell'acido uracil-5-ossiacetico, pseudouracile, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracile, 2-tiouracile, 4-tiouracile, 5-metiluracile, metil estere dell'acido N-uracil-5-ossiacetico, acido uracil-5-ossiacetico, queosina, 2-tiocitosina, 5-propiluracile, 5-propilcitosina, 5-etiluracile, 5-etilcitosina, 5-butiluracile, 5-pentiluracile, 5-pentilcitosina e 2,6-diamminopurina, metilpseudouracile, 1-metilguanina, 1-metilcitosina.

Procedimenti relativi all'uso di RNAi per silenziare geni in *C. elegans*, *Drosophila*, piante e mammiferi, sono noti nel campo (Fire A., et al., 1998, *Nature*, 391:806-811; Fire A., *Trends Genet.*, 15, 358-363 (1999); Sharp P.A., *RNA Interference*, 2001, *Genes Dev.*, 15, 485-490 (2001); Hammond S.M., et al., *Nature Rev. Genet.*, 2, 110-1119 (2001); Tuschl T., *Chem. Biochem.*, 2, 239-245 (2001); Hamilton A., et al., *Science*, 286, 950-952 (1999); Hammond S.M., et al., *Nature*, 404, 293-296 (2000); Zamore P.D., et al., *Cell*, 101, 25-33 (2000); Bernstein E., et al., *Nature*, 409, 363-366 (2001); Elbashir S.M., et al., *Genes Dev.*, 15, 188-200 (2001); WO 0129058; WO 9932619 ed Elabshir S.M., et al., 2001, *Nature*, 411:494-498).

Di conseguenza, la presente divulgazione fornisce acido nucleico che è in grado, quando opportunamente introdotto in, o espresso all'interno di una cellula di mammifero, ad es. di un essere umano, che altrimenti esprime IL-11 o IL-11R, di sopprimere l'espressione di IL-11 o IL-11R da parte di RNAi.

L'acido nucleico può avere sostanziale identità di sequenza ad

una porzione di mRNA di IL-11 o IL-11R, come definito in GenBank numero di accessione NM_000641.3 GI:391353405 (IL-11) o U32324.1 GI:975336 (IL-11R), oppure la sequenza complementare a detto mRNA.

L'acido nucleico può essere siRNA a doppio filamento. (Come l'esperto del ramo potrà notare e come spiegato ulteriormente nel seguito, una molecola di siRNA può includere anche due brevi sequenze di DNA 3'.)

In alternativa, l'acido nucleico può essere un DNA (solitamente DNA a doppio filamento) che, quando trascritto in una cellula di mammifero, dà un RNA avente due porzioni complementari unite attraverso uno spaziatore, così che l'RNA assume la forma di una forcina quando le porzioni complementari ibridizzano fra di loro. In una cellula di mammifero, la struttura a forcina può essere scissa dalla molecola mediante l'enzima DICER, per dare due molecole di RNA distinte, ma ibridizzate.

In alcune forme di realizzazione preferite, l'acido nucleico è generalmente bersagliato alla sequenza di una di SEQ ID NO:2-5 (IL-11; Figura 11) o una di SEQ ID NO:7-10 (IL-11R; Figura 12).

Solamente regioni a filamento singolo (cioè non auto-ibridizzate) di un trascritto di mRNA si sospetta che siano bersagli adatti per RNAi. Si propone quindi che altre sequenze molto prossime al trascritto di mRNA di IL-11 o IL-11R alla sequenza rappresentata da una di SEQ ID NO:2-5 o 7-10, possono essere bersagli adatti per RNAi. Tali sequenze bersaglio sono preferibilmente di 17-23 nucleotidi di lunghezza e preferibilmente si sovrappongono ad una di

SEQ ID NO:2-5 o 7-10 da almeno 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o tutti i 19 nucleotidi (in corrispondenza dell'una o dell'altra estremità di SEQ ID NO:2-5 o 7-10).

Di conseguenza, la presente divulgazione fornisce acido nucleico che è in grado, quando opportunamente introdotto in ed espresso in una cellula di mammifero che altrimenti esprime IL-11 o IL-11R, di sopprimere l'espressione di IL-11 o IL-11R da parte di RNAi, in cui l'acido nucleico è in generale bersagliato alla sequenza di una di SEQ ID NO:2-5 o 7-10.

Con "generalmente bersagliato" si intende che l'acido nucleico può bersagliare una sequenza che si sovrappone a SEQ ID NO:2-5 o 7-10. In particolare, l'acido nucleico può bersagliare una sequenza di mRNA di IL-11 o IL-11R umano che è leggermente più lunga o più corta di una di SEQ ID NO:2-5 o 7-10 (preferibilmente da 17-23 nucleotidi di lunghezza), ma che è peraltro identica ad una di SEQ ID NO:2-5 o 7-10.

Ci si aspetta che la perfetta identità/complementarietà fra l'acido nucleico e la sequenza bersaglio non sia essenziale, sebbene preferita. Di conseguenza, l'acido nucleico può includere un singolo mismatch rispetto a mRNA di IL-11 o IL-11R. Ci si aspetta, tuttavia, che la presenza di anche un solo mismatch sia probabile che porti a ridotta efficienza, cosicché si preferisce l'assenza di mismatch. Quando presenti, overhang o sporgenze 3' possono essere escluse dalla considerazione del numero di mismatch.

Il termine "complementarietà" non è limitato all'appaiamento di

basi convenzionali fra acido nucleico che consiste di ribo e/o deossiribonucleotidi presenti in natura, ma comprende anche appaiamento di basi fra mRNA ed acidi nucleici e non include nucleotidi non naturali.

In una forma di realizzazione, l'acido nucleico (indicato qui come siRNA a doppio filamento) comprende le sequenze di RNA a doppio filamento mostrate in Figura 13 (IL-11; SEQ ID NO:11-14).

In un'altra forma di realizzazione, l'acido nucleico (indicato qui come siRNA a doppio filamento) comprende le sequenze di RNA a doppio filamento mostrate in Figura 14 (IL-11R; SEQ ID NO:15-18).

Tuttavia, ci si deve anche aspettare che sequenze leggermente più corte o più lunghe dirette alla medesima regione di mRNA di IL-11 o IL-11R sono pure efficaci. In particolare, ci si aspetta che sequenze a doppio filamento fra 17 e 23 bp di lunghezza sono pure efficaci.

I filamenti che formano RNA a doppio filamento possono avere overhang di dinucleotidi 3' brevi o corti, che possono essere DNA o RNA. L'uso di un overhang di DNA 3' non ha effetto sull'attività di siRNA rispetto ad un overhang di RNA 3', ma riduce il costo della sintesi chimica dei filamenti di acido nucleico (Elbashir et al., 2001c). Per questa ragione, possono essere preferiti dinucleotidi di DNA.

Quando presenti, gli overhang di dinucleotidi possono essere simmetrici fra di loro, sebbene ciò non sia essenziale. In effetti, l'overhang 3' nel filamento di senso (superiore) è irrilevante per

l'attività di RNAi, poiché non partecipa al riconoscimento o degrado di mRNA (Elbashir et al., 2001a, 2001b, 2001c).

Sebbene esperimenti di RNAi nella *Drosophila* mostrino che overhang 3' antisense possono partecipare al riconoscimento ed al bersagliamento in mRNA (Elbashir et al., 2001c), overhang 3' non appaiono necessari per l'attività di RNAi di siRNA in cellule di mammifero. Annealing scorretto di overhang 3' si ritiene quindi che abbia scarso effetto nelle cellule di mammifero (Elbashir et al., 2001c; Czauderna et al., 2003).

Un quantitativo overhang di dinucleotidi può quindi essere usato nel filamento antisense di siRNA. Nondimeno, il dinucleotide è preferibilmente -UU o -UG (o -TT o -TG se l'overhang è DNA), più preferibilmente -UU (o -TT). L'overhang di dinucleotidi -UU (o -TT) è maggiormente efficace ed è coerente con (cioè in grado di far parte di) l'estremità di RNA polimerasi III del segnale di trascrizione (il segnale terminatore è TTTT). Di conseguenza, questo dinucleotide è maggiormente preferito. Possono anche essere utilizzati i dinucleotidi AA, CC e GG, ma sono meno efficaci, di conseguenza meno preferiti.

Inoltre, gli overhang 3' possono essere omessi interamente da siRNA.

La presente divulgazione fornisce anche acidi nucleici a filamento singolo (indicati qui come siRNA a filamento singolo) che consistono rispettivamente di un filamento componente di uno degli acidi nucleici a doppio filamento menzionati sopra, preferibilmente

con overhang 3', ma opzionalmente senza. La presente divulgazione fornisce anche kit che contengono coppie di tali acidi nucleici a filamento singolo, che sono in grado di ibridizzare fra di loro *in vitro* per formare i siRNA a doppio filamento menzionati sopra che possono quindi essere introdotti nelle cellule.

La presente divulgazione fornisce anche DNA che, quando trascritto in una cellula di mammifero, dà un RNA (indicato qui come shRNA) avente due porzioni complementari che sono in grado di auto-ibridizzarsi per produrre un motivo a doppio filamento, ad es. comprendente una sequenza dal gruppo che consiste di SEQ ID NO:11-14 o 15-18 o una sequenza che differisce da una qualsiasi delle sequenze menzionate sopra per una sostituzione di un paio di basi singola.

Le porzioni complementari in generale saranno unite da uno spaziatore, che ha lunghezza adatta ed una sequenza tale da consentire che le due porzioni complementari ibridizzino fra di loro. Le due porzioni complementari (cioè senso ed antisenso) possono essere unità 5'-3' in qualsiasi ordine. Lo spaziatore tipicamente sarà una sequenza corta, di approssimativamente 4-12 nucleotidi, preferibilmente 4-9 nucleotidi, più preferibilmente 6-9 nucleotidi.

Preferibilmente l'estremità in 5' dello spaziatore (immediatamente in 3' della porzione complementare a monte) consiste dei nucleotidi -UU- o -UG-, ancora preferibilmente -UU- (anche se, ancora, l'uso di questi particolari dinucleotidi non è essenziale). Uno spaziatore adatto, raccomandato per l'uso nel sistema pSuper di OligoEngine (Seattle, Washington, USA) è UUCAAGAGA. In questo ed

altri casi, le estremità dello spaziatore possono ibridizzare fra di loro, ad es. allungando il motivo a doppio filamento oltre le sequenze esatte di SEQ ID NO:11-14 o 15-18 di un piccolo numero (ad es. 1 o 2) paia di basi.

Analogamente, l'RNA trascritto comprende preferibilmente un overhang 3' dalla porzione complementare a valle. Di nuovo, questo è preferibilmente -UU o -UG, più preferibilmente -UU.

Tali molecole di shRNA possono quindi essere scisse nella cellula di mammifero mediante l'enzima DICER per dare un siRNA a doppio filamento come descritto sopra, in cui uno o ciascun filamento del dsRNA ibridizzato comprende un overhang 3'.

Tecniche per la sintesi degli acidi nucleici della presente divulgazione sono naturalmente ben note nel campo.

L'esperto del ramo è ben in grado di costruire vettori di trascrizione adatti per il DNA della presente divulgazione utilizzando tecniche ben note e materiali disponibili in commercio. In particolare, il DNA sarà associato con sequenze di controllo, compresi un promotore ed una sequenze di terminazione della trascrizione.

Di particolare utilità sono i sistemi disponibili in commercio pSuper e pSuperior di OligoEngine (Seattle, Washington, USA). Questi utilizzano un promotore della polimerasi III (H1) ed una sequenza di terminazione della trascrizione T₃ che contribuisce con due residui U all'estremità 3' del trascritto (che, dopo trattamento con DICER, forniscono un overhang 3' UU di un filamento del siRNA).

Un altro sistema adatto è descritto in Shin et al. (RNA, maggio 2009; 15(5):898-910), che utilizza un altro promotore della polimerasi III (U6).

I siRNA a doppio filamento della presente divulgazione possono essere introdotti in cellule di mammifero *in vitro* o *in vivo* utilizzando tecniche note, come descritto nel seguito, per sopprimere l'espressione di IL-11 o IL-11R.

Analogamente, vettori di trascrizione che contengono i DNA della presente divulgazione possono essere introdotti in cellule tumorali *in vitro* o *in vivo* utilizzando tecniche note, come descritto nel seguito, per l'espressione transitoria o stabile di RNA, ancora per sopprimere l'espressione di IL-11 o IL-11R.

Di conseguenza, la presente divulgazione fornisce inoltre un metodo per sopprimere l'espressione di IL-11 o IL-11R in un mammifero, ad es. una cellula umana, il metodo comprendendo somministrare alla cellula un siRNA a doppio filamento dell'invenzione o un vettore di trascrizione dell'invenzione.

Analogamente, la presente divulgazione fornisce inoltre un metodo per il trattamento della fibrosi, il metodo comprendendo somministrare ad un soggetto un siRNA a doppio filamento del o un vettore di trascrizione qui divulgato.

La presente divulgazione fornisce anche siRNA a doppio filamento e vettori di trascrizione qui divulgati per uso in un metodo di trattamento, preferibilmente un metodo per il trattamento della fibrosi.

La presente divulgazione fornisce inoltre l'uso di siRNA a doppio filamento e vettori di trascrizione qui descritti nella preparazione di un medicinale per il trattamento della fibrosi.

La presente divulgazione fornisce inoltre una composizione comprendente un siRNA a doppio filamento o un vettore di trascrizione qui divulgato in miscela con uno o più veicoli farmaceuticamente accettabili. Veicoli adatti comprendono veicoli lipofili o vescicole, che possono aiutare nella penetrazione della membrana cellulare.

Materiali e metodi adatti per la somministrazione di duplex di siRNA e vettori di DNA della presente divulgazione sono ben noti nel campo e metodi migliorati sono in corso di sviluppo, dato il potenziale della tecnologia di RNAi.

In generale, sono disponibili molte tecniche per introdurre acidi nucleici in cellule di mammifero. La scelta della tecnica dipenderà da se l'acido nucleico viene trasferito nelle cellule coltivate *in vitro* o *in vivo* nelle cellule di un paziente. Tecniche adatte per il trasferimento di acido nucleico in cellule di mammifero *in vitro* comprendono l'uso di liposomi, elettroporazione, microiniezione, fusione cellulare, DEAE destrano e precipitazione con fosfato di calcio. Tecniche di trasferimento di geni *in vivo* comprendono transfezione con vettori virali (tipicamente retrovirali) e transfezione mediata dalla proteina di rivestimento virale-liposoma (Dzau et al. (2003), Trends in Biotechnology, 11, 205-210).

In particolare, tecniche adatte per la somministrazione cellulare degli acidi nucleici della presente divulgazione sia *in*

vitro che *in vivo* sono descritte nei seguenti articoli:

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

Erogazione sistemica utilizzando liposomi: Lewis D.L., J.E. Hangstrom, A.G. Loomis, J.A. Wolff e H. Herwijer, 2002, Efficient delivery of siRNA per inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat. Genet.*, 32:107-8. Paul C.P., P.D. Good, I. Winter e D.R. Engelke, 2002, Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 20:505-8. Song E., S.K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar e J. Lieberman, 2003, RNA interference targeting Fas protects mice from fulminante hepatitis. *Nat. Med.*, 9:347-51. Sirensen D.R., M. Leirdal e M. Sioud, 2003, Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNA in adult mice. *J. Mol. Biol.*, 327:761-6.

Trasferimento mediato da virus: Abbas-Terki T., W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralong e P. Aebischer, 2002, Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 13:2197-201. Barton G.M. e R.

Medzhitov, 2002, Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14943-5. Devroe E. e P.A. Silver, 2002, Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol.*, 2:15. Lori F., P. Guallini, L. Galluzzi e J. Lisziewicz, 2002, Gene therapy approaches to HIV infection. *Am. J. Pharmacogenomics*, 2:245-52. Matta H., B. Hozayev, R. Tomar, P. Chugh e P.M. Chaudhary, 2003, Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. *Cancer Biol. Ther.*, 2:206-10. Qin X.F., D.S. An, I.S. Chen e D. Baltimore, 2003, Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:183-8. Scherr M., K. Battmer, A. Ganser e M. Eder, 2003a, Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle*, 2:251-7. Schen C., A.K. Buck, X. Liu, M. Winkler e S.N. Reske, 2003, Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett.*, 529:111-4.

Erogazione o somministrazione di peptidi: Morris M.C., L. Chaloin, F. Heitz e G. Divita, 2000, Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11:461-6. Simeoni F., M.C. Morris, F. Heitz e G. Divita, 2003, Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery systems MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 31:2717-24. Altre tecnologie che possono essere adatte all'erogazione di siRNA alle cellule bersaglio si basano su nanoparticelle o nanocapsule come quelle descritte nei Brevetti US numeri 6.649.192B e 5.843.509B.

Formulazioni

In applicazioni terapeutiche, agenti in grado di inibire l'azione di IL-11 o agenti in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R sono formulati preferibilmente come medicinali o sostanza farmaceutica insieme ad uno o più ingrediente farmaceuticamente accettabili ben noti agli esperti del ramo, compresi, senza limitazioni, veicoli, adiuvanti, eccipienti, diluenti, riempitivi, tamponi, conservanti, antiossidanti, lubrificanti, stabilizzanti, solubilizzanti, tensioattivi (ad es. agenti bagnanti), agenti di mascheratura, agenti coloranti, agenti aromatizzanti ed agenti edulcoranti farmaceuticamente accettabili.

Il termine "farmaceuticamente accettabile" come qui usato, riguarda composti, ingredienti, materiali, composizioni, forme di dosaggio, ecc., che secondo il sano giudizio medico, sono adatti per l'uso a contatto con i tessuti del soggetto in questione (ad es. un essere umano) senza eccessiva tossicità ed irritazione, risposta allergica o altro problema o complicanza, commensurato con un ragionevole rapporto beneficio/rischio. Ciascun veicolo, adiuvante, eccipiente, ecc., deve inoltre essere "accettabile" nel senso di essere compatibile con gli altri ingredienti della formulazione.

Veicoli, adiuvanti, eccipienti, ecc., adatti si possono trovare in testi farmaceutici standard, ad esempio, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edizione, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; e Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edizione, 1994.

Le formulazioni possono essere preparate mediante qualsiasi

procedimento ben noto nel campo della farmacia. Tali procedimenti comprendono la fase di portare in associazione il composto attivo con un veicolo che costituisce uno o più ingredienti accessori. In generale, le formulazioni vengono preparate portando in associazione uniformemente ed intimamente il composto attivo con veicoli (ad es., veicoli liquidi, veicolo solido finemente diviso, ecc.) e quindi sagomando il prodotto, se necessario.

Le formulazioni possono essere preparate per le vie di somministrazione topica, parenterale, sistemica, endovenosa, intra-arteriosa, intramuscolare, intratecale, intraoculare, intra-congiuntivale, sottocutanea, orale o transdermica che possono includere iniezione. Formulazioni iniettabili possono comprendere l'agente selezionato in un mezzo sterile o isotonico.

La somministrazione è preferibilmente in una "quantità terapeuticamente efficace", questo essendo sufficiente a mostrare beneficio per l'individuo. La quantità effettiva somministrata ed il tasso ed il corso di somministrazione nel tempo, dipenderanno dalla natura e della gravità della malattia che viene trattata. La prescrizione di trattamento, ad es. decisioni sul dosaggio, ecc., rientra nella responsabilità dei medici generaci ed altri dottori in medicina e tipicamente prende in considerazione il disturbo da trattare, la condizione del singolo paziente, il sito di erogazione, il procedimento di somministrazione ed altri fattori noti agli esperti. Esempi di tecniche e di protocolli menzionati sopra si possono trovare in Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edizione,

2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

Fibrosi

Come qui usato, "fibrosi" si riferisce alla formazione di tessuto connettivo fibroso in eccesso come risultato di deposizione in eccesso di componenti della matrice extracellulare, ad esempio collagene. Il tessuto fibroso connettivo è caratterizzato dall'avere una matrice extracellulare (ECM) con un elevato contenuto di collagene. Il collagene può essere fornito in filamenti o fibre, che possono essere disposti in modo regolare oppure allineati. L'ECM di tessuto connettivo fibroso può anche includere glicosamminoglicani.

Come usato qui, "tessuto connettivo fibroso in eccesso" si riferisce ad una quantità di tessuto connettivo in una data posizione (ad es., un dato tessuto o organo o parte di un dato tessuto o organo) che è più grande della quantità del tessuto connettivo presente in quella posizione in assenza di fibrosi, ad es. in condizioni normali, non patologiche. Come qui usato, "deposizione in eccesso di componenti di matrice extracellulare" si riferisce ad un livello di deposizione di uno o più componenti di matrice extracellulare che è maggiore del livello di deposizione in assenza di fibrosi, ad es, in condizioni normali, non patologiche.

I meccanismi cellulari e molecolari della fibrosi sono descritti in Wynn, J. Pathol. (2008), 214(2):199-210 ed in Wynn e Ramalingam, Nature Medicine (2012), 18:1028-1040.

Gli effettori cellulari principali della fibrosi sono miofibroblasti, che producono una matrice extracellulare ricca di

collagene.

In risposta alla lesione del tessuto, cellule danneggiate e leucociti producono fattori pro-fibrotici come TGF β , IL-13 e PDGF, che attivano i fibroblasti a miofibroblasti che esprimono α SMA e che reclutano miofibroblasti dal sito della lesione. I miofibroblasti producono una grossa quantità di matrice extracellulare e sono importanti mediatori nell'aiutare la contrattura e la chiusura della ferita. Tuttavia, in condizioni di persistente infezione o durante infiammazione cronica, vi può essere sovra-attivazione e reclutamento di miofibroblasti e quindi sovrapproduzione di componenti della matrice extracellulare con il risultato di formazione di tessuto connettivo fibroso in eccesso.

In alcune forme di realizzazione, la fibrosi può essere innescata da condizioni patologiche, ad es. condizioni, infezioni o stati di malattia che portano alla produzione di fattori pro-fibrotici come TGF β 1. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi può essere provocata da lesione/stimoli fisici, lesione/stimoli chimici o lesione/stimoli ambientali. Lesioni/stimoli fisici possono verificarsi durante intervento chirurgico, ad es. cause iatrogene. Lesione/stimoli chimici possono comprendere fibrosi indotta da farmaci, ad es. in seguito alla somministrazione cronica di farmaci come bleomicina, ciclofosfamide, amiodarone, procainamide, penicillamina, oro e nitrofurantoina (Daba et al., Saudi Med. J., giugno 2004, 25(6):700-6). Lesione/stimoli ambientali possono includere esposizione a fibre di amianto o silice.

La fibrosi può verificarsi in molti tessuti del corpo. Ad esempio, la fibrosi può avvenire nel fegato (ad es. cirrosi), polmoni, rene, cuore, vasi sanguigni, occhio, pelle, pancreas, intestino, cervello e midollo osseo. La fibrosi può anche verificarsi in organi multipli allo stesso momento.

Nelle forme di realizzazione qui, la fibrosi può implicare un organo del sistema gastrointestinale, ad es. del fegato, intestino tenue, intestino crasso o pancreas. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi può implicare un organo del sistema respiratorio, ad es. i polmoni. Nelle forme di realizzazione, la fibrosi può implicare un organo del sistema cardiovascolare, ad es. cuore o vasi sanguigni. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi può interessare la pelle. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi può interessare un organo del sistema nervoso, ad es. il cervello. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi può implicare un organo del sistema urinario, ad es. i reni. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi può implicare un organo del sistema muscolo-scheletrico, ad es. il tessuto muscolare.

In alcune forme di realizzazione preferite, la fibrosi è fibrosi cardiaca o miocardica, fibrosi epatica o fibrosi renale. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi cardiaca o miocardica è associata a disfunzione della muscolatura o delle proprietà elettriche del cuore o ispessimento delle parete o delle valvole del cuore. In alcune forme di realizzazione, la fibrosi è dell'atrio e/o dei ventricoli del cuore. Il trattamento o la prevenzione della fibrosi

atriale o ventricolare può aiutare a ridurre il rischio della insorgenza di fibrillazione atriale, fibrillazione ventricolare o infarto miocardico.

In alcune forme di realizzazione preferite, la fibrosi epatica è associata alla malattia cronica del fegato o cirrosi epatica. In alcune forme di realizzazione preferite, la fibrosi renale è associata alla malattia renale cronica.

Malattie/condizioni caratterizzate da fibrosi, in conformità con la presente invenzione comprendono, senza limitazioni: condizioni respiratorie come fibrosi polmonare, fibrosi cistica, fibrosi polmonare idiopatica, fibrosi progressiva massiva, scleroderma, bronchiolite obliterante, sindrome di Hermansky-Pudlak, asbestosi, silicosi, ipertensione polmonare cronica, ipertensione polmonare associata ad AIDS, sarcoidosi, stroma di tumore nella malattia dei polmoni ed asma; malattia epatica cronica, cirrosi biliare primaria (PBC), malattia epatica schistosomiale, cirrosi epatica; condizioni cardiovascolari come cardiomiopatia ipertrofica, cardiomiopatia dilatata (DCM), fibrosi dell'atrio, fibrillazione atriale, fibrosi del ventricolo, fibrillazione ventricolare, fibrosi miocardica, sindrome di Brugada, miocardite, fibrosi endomiocardica, infarto miocardico, malattia vascolare fibrotica, malattia cardiaca ipertensiva, cardiomiopatia del ventricolo destro aritmogenica, (ARVC), fibrosi tubulointerstiziale e glomerulare, aterosclerosi, veni varicose, infarti cerebrali; condizioni neurologiche come gliosi e morbo di Alzheimer; distrofia muscolare come distrofia muscolare di

Duchenne (DMD) o distrofia muscolare di Becker (BMD); condizioni gastrointestinali come morbo di Chron, colite microscopica e solangite sclerosante primaria (PSC); condizioni della pelle come scleroderma, fibrosi sistemica nefrogenica e cheloide della cute; artrofibrosi; contrattura di Dupuytren; fibrosi mediastinale; fibrosi retroperitoneale; mielofibrosi; malattia di Peyronie; capsulite adesiva; malattia renale (ad es., fibrosi renale, sindrome nefritica, sindrome di Alport, nefropatia associata a HIV, malattia policistica dei reni, malattia di Fabry, nefropatia diabetica, glomerulonefrite cronica, nefrite associata con lupus sistemico); sclerosi sistemica progressiva (PSS); malattia cronica del trapianto contro l'ospite; malattia dell'occhio come oftalmopatia di Grave, fibrosi epiretinica, fibrosi retinica, fibrosi subretinica (ad es. associata alla degenerazione maculare (ad es. degenerazione maculare legata all'età umida (AMD)), retinopatia diabetica, glaucoma, fibrosi corneale, fibrosi post-chirurgica (ad es. della capsula posteriore in seguito ad intervento chirurgico della cataratta o blebo in seguito a trabeclectomia per il glaucoma), fibrosi congiuntivale, fibrosi subcongiuntivale; artrite; malattia pre-neoplastica fibrotica e neoplastica fibrotica; e fibrosi indotta da insulto chimico o ambientale (ad es., chemioterapie per il cancro, pesticidi, radiazioni/radioterapia per il cancro).

Si apprezzerà che molte delle malattie/condizioni elencate sopra sono intercorrelate. Ad esempio, la fibrosi del ventricolo può verificarsi post-infarto miocardico ed è associata a DCM, HCM e

miocardite.

In forme di realizzazione particolari, la malattia/disturbo può essere una fra fibrosi polmonare, fibrillazione atriale, fibrillazione ventricolare, cardiomiopatia ipertrofica (HCM), cardiomiopatia dilatata (DCM), steatoepatite non alcolica (NASH), corrosi, malattia cronica renale, scleroderma, sclerosi sistemica, cheloide, fibrosi cistica, morbo di Chron, fibrosi post-chirurgica o fibrosi retinica.

Il trattamento, prevenzione o alleviazione della fibrosi secondo la presente divulgazione può essere fibrosi che è associata ad una sovra-regolazione di IL-11, ad es. una sovra-regolazione di IL-11 in cellule o tessuto in cui la fibrosi si verifica o può verificarsi, o sovra-regolazione di IL-11 o IL-11R extracellulare.

Il trattamento o alleviamento della fibrosi può essere efficace per impedire la progressione della fibrosi, ad es. impedire il peggioramento della condizione o rallentare il tasso di sviluppo della fibrosi. In alcune forme di realizzazione, il trattamento o alleviamento può portare a miglioramento nella fibrosi, ad es. una riduzione della quantità di fibre di collagene depositate.

Prevenzione della fibrosi può riferirsi a prevenzione di un peggioramento della condizione o prevenzione dello sviluppo della fibrosi, ad es. prevenzione di fibrosi in stadio iniziale che si sviluppa in uno stadio successivo cronico.

Soggetto

Il soggetto da trattare può essere un qualsiasi animale o essere

umano. Il soggetto è preferibilmente un mammifero, più preferibilmente un essere umano. Il soggetto può essere un mammifero non umano, ma è più preferibilmente un essere umano. Il soggetto può essere maschio o femmina. Il soggetto può essere un paziente.

Campione

Un campione ottenuto da un soggetto può essere di qualsiasi tipo. Un campione biologico può essere preso da un qualsiasi tessuto o fluido corporeo, ad es. un campione di sangue, campione derivato da sangue, campione di siero, campione di linfa, campione di seme, campione di saliva, campione di fluido sinoviale. Un campione derivato dal sangue può essere scelto da una frazione di sangue di un paziente, ad es. una frazione contenente cellule scelte o un plasma o frazione sierica. Un campione può comprendere un campione di tessuto o biopsia; oppure cellule isolate da un soggetto. I campioni possono essere raccolti mediante tecniche note, come biopsia o ago aspirato. I campioni possono essere conservati e/o lavorati per la determinazione successiva di livelli di espressione di IL-11.

I campioni possono essere utilizzati per determinare la sovra-regolazione di IL-11 o IL-11R nel soggetto dal quale è stato prelevato il campione.

In alcune forme di realizzazione preferite, un campione può essere un campione di tessuto, ad es. una biopsia prelevata dal cuore, dal fegato o dal rene. In alcune forme di realizzazione, un campione può essere un campione di tessuto, ad es. una biopsia, prelevata dall'occhio.

Un campione può contenere cellule e può preferibilmente contenere fibroblasti e/o miofibroblasti. In alcune forme di realizzazione, i fibroblasti o i miofibroblasti possono essere ottenuti da tessuto del cuore, fegato o reni, ad es. essi possono essere fibroblasti cardiaci o miofibroblasti cardiaci (si veda, ad es., Colby et al., Circulation Research, 2009; 105:1164-1176), di fibroblasti epatici o miofibroblasti epatici (si veda, ad es., Zeisberg et al., The Journal of Biological Chemistry, 10 agosto 2007, 282, 23337-23347; Brenner, Fibrogenesis & Tissue Repair, 2012, 5 (Suppl. 1):S17) o di fibroblasti renali o miofibroblasti renali (si veda, ad es., Strutz e Zeisberg. JASN, novembre 2006, vol. 17, n. 11, 2992-2998). In alcune forme di realizzazione, i fibroblasti o i miofibroblasti possono essere ottenuti dal tessuto oculare, ad es., possono essere fibroblasti della cornea.

Sovra-regolazione dell'espressione di IL-11 o IL-11R

Alcuni aspetti e forme di realizzazione della presente divulgazione riguarda la rivelazione dell'espressione di IL-11 o IL-11R, ad es. in un campione ottenuto da un soggetto.

In alcuni aspetti e forme di realizzazione, la presente divulgazione riguarda la sovra-regolazione di espressione (sovra-espressione) di IL-11 o IL-11R (come una proteina o oligonucleotide che codifica il rispettivo IL-11 o IL-11R) e rivelazione di tale sovra-regolazione come regolatore di adeguatezza per il trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o con un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R.

La sovra-regolazione di espressione di IL-11 o IL-11R comprende l'espressione di IL-11 o IL-11R ad un livello maggiore di quanto ci si aspetta normalmente per una cellula o tessuto di un dato tipo. La sovra-regolazione può essere determinata determinando il livello di espressione di IL-11 o IL-11R in un tessuto o cellula. Un confronto può essere effettuato fra il livello dell'espressione di IL-11 o IL-11R in una cellula o campione di tessuto da un soggetto ed un livello di riferimento di IL-11 o IL-11R, ad es. un valore o intervallo di valori che rappresentano un livello normale di espressione di IL-11 o IL-11R per la medesima cellula o tipo di tessuto o cellula o cellula o tipo di tessuto corrispondente. In alcune forme di realizzazione, i livelli di riferimento possono essere determinati rivelando l'espressione di IL-11 o IL-11R in un campione di controllo, ad es. in cellule o tessuto corrispondenti da un soggetto sano o da un tessuto sano del medesimo soggetto. In alcune forme di realizzazione, i livelli di riferimento possono essere ottenuti da una curva standard o gruppi di dati.

I livelli di espressione possono essere quantificati per il confronto assoluto o possono essere effettuati i confronti relativi.

In alcune forme di realizzazione, la sovra-regolazione di IL-11 o IL-11R può essere considerata presente quando il livello di espressione nel campione in analisi è almeno 1,1 volte quello di un livello di riferimento. Più preferibilmente, il livello di espressione può essere scelto da uno di almeno 1,2, almeno 1,3, almeno 1,4, almeno 1,5, almeno 1,6, almeno 1,7, almeno 1,8, almeno

1,9, almeno 2,0, almeno 2,1, almeno 2,2, almeno 2,3, almeno 2,4, almeno 2,5, almeno 2,6, almeno 2,7, almeno 2,8, almeno 2,9, almeno 3,0, almeno 3,5, almeno 4,0, almeno 5,0, almeno 6,0, almeno 7,0, almeno 8,0, almeno 9,0 o almeno 10,0 volte quello del livello di riferimento.

I livelli di espressione di IL-11 o IL-11R possono essere determinati mediante uno di una pluralità di tecniche di analisi *in vitro* note, come analisi basata su PCR, analisi di ibridizzazione *in situ*, analisi di flussocitometria, analisi immunologica o immunoistochimica.

A titolo di esempio, tecniche adatte implicano un procedimento di rivelare il livello di IL-11 o IL-11R in un campione ponendo a contatto il campione con un agente in grado di legare IL-11 o IL-11R e rivelare la formazione di un complesso dell'agente e IL-11 o IL-11R. L'agente può essere una qualsiasi molecola di legame adatta, ad es. un anticorpo, polipeptide, peptide, oligonucleotide, aptamero o piccola molecola e può essere opzionalmente marcato per consentire la rivelazione, ad es. visualizzazione dei complessi formati. Marcatori e mezzi adatti per la rivelazione sono ben noti agli esperti del ramo e comprendono marcatori fluorescenti (ad es., fluoresceina, rodamina, eosina e NDB, proteina fluorescente verde (GFP), chelati di terre rare come europio (E), terbio (Tb) e samario (Sm), tetrametil rodamina, rosso Texas, 4-metil umbelliferone, 7-ammino-4-metil coumarina, Cy3, Cy5), marcatori isotopici, radioisotopi (ad es. ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S), marcatori di chemiluminescenza (ad es. estere di

acridinio, luminolo, isoluminolo), enzimi (ad es. perossidasi, fosfatasi alcalina, glucosio ossidasi, beta-galattosidasi, luciferasi), anticorpi, ligandi e recettori. Tecniche di rivelazione sono ben note agli esperti del ramo e possono essere scelte per corrispondere con l'agente di marcatura. Tecniche adatte comprendono amplificazione di PCR di tag di oligonucleotidi, spettrometria di massa, rivelazione di fluorescenza o colore, ad es. in seguito alla conversione enzimatica di un substrato da parte di una proteina reporter o rivelazione di radioattività.

Le analisi possono essere configurate per quantificare la qualsiasi di IL-11 o IL-11R in un campione. Qualsiasi quantificate di IL-11 o IL-11R da un campione di test possono essere confrontate con i valori di riferimento ed il confronto utilizzato per determinare se il campione in analisi contiene una qualsiasi di IL-11 o IL-11R che è maggiore o minore di quella del valore di riferimento in un grado scelto di significanza statistica.

La quantificazione di IL-11 o IL-11R rivelata può essere utilizzata per determinare la sovra-regolazione o sotto-regolazione o l'amplificazione di geni che codificano IL-11 o IL-11R. Nei casi in cui il campione in analisi contiene cellule fibrotiche, tale sovra-regolazione, sotto-regolazione o amplificazione possono essere confrontate con il valore di riferimento per determinare se è presente una qualsiasi differenza statisticamente significativa.

Selezione del soggetto

Un soggetto può essere scelto per il trattamento sulla base di

una determinazione che il soggetto ha un livello sovra-regolato di espressione di IL-11 o IL-11R. IL-11 o IL-11R possono quindi agire come marcatori di una fibrosi adatta al trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o con un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R.

La sovra-regolazione può essere in un dato tessuto o in cellule scelte da un dato tessuto. Un tessuto preferito può essere uno da cuore, fegato o rene. Un tessuto preferito può essere l'occhio. Un tipo di cellule preferite possono essere fibroblasti o miofibroblasti. La sovra-regolazione può anche essere determinata in un fluido in circolo, ad es. sangue o in un campione derivato dal sangue. La sovra-regolazione può essere di IL-11 o IL-11R extracellulare.

La determinazione dei livelli di IL-11 o IL-11R può essere condotta mediante analisi, preferibilmente *in vitro*, su un campione ottenuto da un soggetto, come qui descritto.

Dopo la selezione, un soggetto può essere sottoposto a trattamento per la fibrosi mediante somministrazione di un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R.

In alcune forme di realizzazione, ad un soggetto può essere stata diagnosticata la fibrosi, si può sospettare che abbia la fibrosi o può essere considerato a rischio di sviluppare la fibrosi ed è di interesse se il soggetto trarrà vantaggio dal trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o con un agente in

grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R. In tali forme di realizzazione, l'adeguatezza del soggetto per tale trattamento può essere determinata determinando se l'espressione di IL-11 o IL-11R è sovra-regolata nel soggetto. In alcune forme di realizzazione, l'espressione di IL-11 o IL-11R è localmente o sistemicamente sovra-regolata nel soggetto.

Diagnosi e prognosi

La rivelazione della sovra-regolazione dell'espressione di IL-11 o IL-11R può anche essere utilizzata in un metodo per la diagnosi della fibrosi o rischio di sviluppare la fibrosi in un soggetto ed in procedimenti per la prognosi o predizione della risposta di un soggetto al trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R.

In alcune forme di realizzazione, si può sospettare che un soggetto abbia la fibrosi, ad es. sulla base della presenza di altri sintomi indicativi della fibrosi nel corpo del soggetto o in cellule/tessuti scelti del corpo del soggetto oppure può essere considerato a rischio di sviluppare la fibrosi, ad es. a causa di predisposizione genetica o esposizione a condizioni ambientali, come ad esempio fibre di amianto.

La determinazione della sovra-regolazione di IL-11 o IL-11R può confermare una diagnosi o sospetta diagnosi di fibrosi oppure può confermare che il soggetto è a rischio di sviluppare la fibrosi. La determinazione può anche diagnosticare la condizione o la

predisposizione come una adatta al trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R.

Come tale, si può fornire un metodo per fornire una prognosi per un soggetto che ha, o che si sospetta abbia la fibrosi, il metodo comprendendo il determinare se IL-11 o IL-11R è sovra-regolata in un campione ottenuto dal soggetto e, sulla base della determinazione, fornire una prognosi per il trattamento del soggetto con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R.

In alcuni aspetti, i metodi di diagnosi o metodi di prognosi o predizione della risposta di un soggetto al trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R possono non richiedere la determinazione dei livelli di IL-11 o IL-11R, ma possono essere basati sulla determinazione di fattori genetici nel soggetto che sono predittivi di sovra-regolazione dell'espressione di IL-11 o IL-11R o sovra-regolazione dell'attività di IL-11 o IL-11R. Tali fattori genetici possono includere la determinazione di mutazioni genetiche, polimorfismi di nucleotide singolo (SNP) o amplificazione genica in IL-11 e/o IL-11R che sono correlati con e/o predittivi di sovra-regolazione dell'espressione o dell'attività di IL-11 o IL-11R o di attività di segnalazione mediata da IL-11. L'uso di fattori genetici per predire la predisposizione ad uno stato di malattia o risposta al trattamento è noto nel campo, si veda, ad es.,

Peter Stärkel Gut, 2008; 57:440-442; Wright et al., Mol. Cell. Biol., marzo 2010, vol. 30, n. 6, 1411-1420.

I fattori genetici possono essere analizzati mediante metodi noti agli esperti del ramo, compresa analisi basata su PCR, ad es. PCR quantitativa, PCR competitiva. Determinando la presenza dei fattori genetici, ad es. in un campione ottenuto da un soggetto, si può confermare una diagnosi di fibrosi e/o un soggetto può essere classificato come a rischio di sviluppare la fibrosi e/o un soggetto può essere identificato come adatto al trattamento con un agente in grado di inibire l'azione di IL-11 o di un agente in grado di prevenire o ridurre l'espressione di IL-11 o IL-11R.

Alcuni metodi possono comprendere la determinazione della presenza di uno o più SPN collegati alla secrezione di IL-11 o suscettibilità allo sviluppo della fibrosi. Gli SNP sono solitamente biallelici e quindi possono essere facilmente determinati utilizzando una di una pluralità di analisi convenzionali note agli esperti del ramo (si veda, ad es., Anthony J. Brookes. The essence of SNPs. Gene, Volume 234, 2ª edizione, 8 giugno 1999, 177-186; Fan et al., Highly Parallel SNP Genotyping. Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol., 2003, 68:69-78; Matsuzaki et al., Parallel Genotyping of Over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high density oligonucleotide array. Genome Res., 14:414-425).

I metodi possono comprendere determinare quale allele di SNP è presente in un campione ottenuto da un soggetto. In alcune forme di realizzazione, determinare la presenza dell'allele minore può essere

associato alla secrezione di IL-11 aumentata o suscettibilità di sviluppo della fibrosi.

Di conseguenza, la presente divulgazione fornisce un metodo per lo screening di un soggetto, il procedimento comprendendo:

ottenere un campione di acido nucleico dal soggetto;

determinare quale allele è presente nel campione in corrispondenza della posizione del nucleotide polimorfo di uno o più degli SNP elencati in Figura 33 e/o Figura 34 e/o Figura 35 o un SNP in disequilibrio di collegamento con uno degli SNP collegati con un $r^2 \geq 0,8$.

La fase di determinazione può comprendere determinare se l'allele minore è presente nel campione in corrispondenza della posizione del nucleotide polimorfico scelto. Può comprendere determinare se sono presenti 0, 1 o 2 alleli minori.

Il metodo di screening può essere, oppure far parte, di un metodo per determinare la suscettibilità del soggetto allo sviluppo della fibrosi, oppure un metodo per la diagnosi o la prognosi come qui descritto.

Il metodo può inoltre comprendere la fase di identificare il soggetto come avente suscettibilità a, o un rischio aumentato di, sviluppare la fibrosi, ad es. se il soggetto è determinato avere un allele minore in corrispondenza della posizione del nucleotide polimorfico. Il metodo può inoltre comprendere la fase di selezionare il soggetto per il trattamento con un agente in grado di inibire l'azione dell'interleuchina 11 (IL-11) e/o somministrare un agente in

grado di inibire l'azione dell'interleuchina 11 (IL-11) al soggetto al fine di fornire il trattamento per la fibrosi nel soggetto o prevenire lo sviluppo o la progressione della fibrosi nel soggetto.

Gli SNP possono essere determinati includere uno o più degli SNP in Figura 33, Figura 34 o Figura 35. In alcune forme di realizzazione, il metodo può comprendere determinare uno o più degli SNP elencati nella Figura 33. In alcune forme di realizzazione, il metodo può comprendere determinare uno o più degli SNP elencati nella Figura 34. In alcune forme di realizzazione, il procedimento può comprendere determinare uno o più degli SNP elencati nella Figura 35. Gli SNP possono essere scelti per la determinazione come aventi un basso valore P o FDR (false discovery rate o falso tasso di scoperta).

In alcune forme di realizzazione, gli SNP vengono scelti come buoni predittori della risposta al trattamento anti-IL-11 sulla base della regolazione di VSTstim in *trans* (Figura 33). In alcune forme di realizzazione, un metodo può comprendere determinare quale allele è presente per uno o più dei seguenti SNP: rs10831850, rs4756936, rs6485827, rs7120273 e rs895468. In alcune forme di realizzazione, gli SNP vengono scelti come buoni predittori della risposta al trattamento con anti-IL-11 sulla base della regolazione di VSTstim-VSTunstim in *cis* (Figura 34).

In alcune forme di realizzazione, gli SNP sono scelti come buoni predittori della risposta al trattamento con anti-IL-11 sulla base della regolazione di VSTstim-VSTunstim in *trans* (Figura 35). In alcune forme di realizzazione, un procedimento può comprendere

determinare quale allele è presente per uno o più dei seguenti SNP: rs7120273, rs10831850, rs4756936, rs6485827 (Figura 35).

SNP: rs7120273, rs10831850, rs4756936, rs6485827 sono ad alto disequilibrio di collegamento (LD) uno con l'altro sul cromosoma 11 (in un cosiddetto blocco LD) e sono quindi co-ereditati in modo estremamente comune.

Il quadrato della correlazione delle frequenze geniche (r^2) riflette il grado di disequilibrio di legame (LD) fra due SNP. Come risultato di LD fra SNP in regioni locali e quindi co-ereditate del genoma, il genotipo di un dato SNP può essere dedotto determinando il genotipo di un SNP tagging/proxy. La soglia di LD utilizzata nel campo per identificare SNP di tagging/proxy a coppie è un valore r^2 di 0,8 (Wang et al., 2005, Nat. Rev. Genet., 6(2):109-18; Barrett et al., 2006, Nat genet., 38(6):659-662). Il genotipo di un dato SNP può quindi essere dedotto determinando il genotipo di un SNP di tagging/proxy in un disequilibrio di collegamento con un valore r^2 di $\geq 0,8$.

La sequenza nucleotidica degli SNP è indicata utilizzando il numero "rs". L'intera sequenza è disponibile dalla banca dati National Center for Biotechnology Information (NCBI) dei polimorfismi a nucleotidi singoli (dbSNP) accessibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

I metodi di diagnosi o prognosi possono essere condotti *in vitro* su un campione ottenuto da un soggetto oppure dopo il trattamento di un campione ottenuto da un soggetto. Una volta raccolto il campione, il paziente non deve essere presente perché venga condotto il metodo

in vitro di diagnosi o prognosi e quindi il metodo può essere uno che non è realizzato in pratica su un essere umano o corpo animale.

Altri test diagnostici o prognostici possono essere usati in congiunzione con quelli qui descritti per aumentare l'accuratezza della diagnosi o prognosi oppure per confermare un risultato ottenuto utilizzando i test qui descritti.

I metodi secondo la presente divulgazione possono essere compiuti, oppure i prodotti possono essere presenti, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Il termine "*in vitro*" è inteso comprendere esperimenti con materiali, sostanze biologiche, cellule e/o tessuti in condizioni di laboratorio o in coltura mentre il termine "*in vivo*" intende comprendere esperimenti e procedure con organismi multicellulari intatti. "*Ex vivo*" si riferisce a qualcosa presente o che ha luogo all'esterno di un organismo, ad es. all'esterno di un corpo umano o animale, che può essere un tessuto (ad es. interi organi) o cellule prelevate dall'organismo.

La presente divulgazione comprende la combinazione degli aspetti e caratteristiche preferite descritte, eccetto ove tale combinazione è chiaramente inammissibile o espressamente evitata.

L'intestazione delle sezioni usate qui serve per scopi solamente organizzativi e non deve essere interpretata come limitante la materia descritta.

Aspetti e forme di realizzazione della presente divulgazione verranno ora descritti, a titolo di esempio, con riferimento alle figure accluse. Ulteriori aspetti e forme di realizzazione

risulteranno evidenti agli esperti del ramo.

In tutto questo testo, compreso nelle rivendicazioni che seguono, a meno che il contesto non stabilisca chiaramente diversamente, la parole "comprendere" e variazioni come "comprende" e "comprendente" saranno intesi implicare l'inclusione di un intero o fase o gruppo di interi o fasi indicati, ma non l'esclusione di qualsiasi altro intero o fasi o gruppo di interi o fasi.

Si deve notare che, come usato nel testo e nelle rivendicazioni accluse, le forme al singolare "un", "uno/a" e "il/lo/la" comprendono referenze plurali, a meno che il contesto non stabilisca chiaramente diversamente. Gli intervalli possono essere espressi qui come da "circa" un particolare valore e/o a "circa" un altro particolare valore. Quando è espresso un tale intervallo, un'altra forma di realizzazione comprende dal particolare valore e/o all'altro particolare valore. Analogamente, quando i valori sono espressi come approssimazione, mediante l'uso dell'antecedente "circa", si deve comprendere che il particolare valore forma un'altra forma di realizzazione.

Breve descrizione delle figure

Forme di realizzazione ed esperimenti che illustrano i principi dell'invenzione verranno ora discussi con riferimento alle figure accluse, in cui:

Figura 1. La stimolazione di TGF β 1 sovra-regola IL-11 nei fibroblasti. Fibroblasti primari sono stati derivati da tessuto atriale umano di 80 individui ed incubati per 24 ore con e senza

TGF β 1 (5 ng/ml). (a) Il grafico mostra che il IL-11 era il gene pi \dot{u} sovra-regolato in fibroblasti stimolati da TGF β 1 rispetto a 11.433 geni espressi (FPKM \geq 0,5), (b) grafico che mostra l'espressione di IL-11 significativamente aumentata pi \dot{u} di 8 volte in media dopo l'attivazione dei fibroblasti con TGF β 1 (FDR = $9,1 \times 10^{-125}$), (c) il grafico che mostra che RT-qPCR confermava variazioni nel numero di volte basate sull'espressione di RNA di IL-11 (TGF β 1 + TGF β 1; $R^2 = 0,94$), e (d) grafico che mostra che ELISA rivelava un aumento significativo di proteina IL-11 secreta da fibroblasti stimolati.

Figura 2. Fibroblasti atriali umani sono stati incubati o con 5 ng/ml di TGF β 1 o con 5 ng/ml di IL-11 per 24 ore. I grafici mostrano la colorazione cellulare per (a) α -SMA (miofibroblasti), (b) EdU (proliferazione), (c) collagene, e (d) periostina per identificare miofibroblasti e cellule altamente proliferative e per quantificare la produzione di proteine di matrice extracellulare. Si \grave{e} trovato che IL-11 aumenta il rapporto dei miofibroblasti ed induce la produzione di collagene e di periostina ad un tasso simile alla segnalazione di TGF β 1. Questo esperimento \acute{e} stato ripetuto una pluralit \grave{a} di volte con risultati analoghi.

Figura 3. L'inibizione di IL-11 con un anticorpo di neutralizzazione impedisce la fibrosi indotta da TGF β 1. Fibroblasti atriali umani sono stati stimolati con TGF β 1 (5 ng/ml), TGF β 1 e con un anticorpo contro IL-11 o TGF β 1 ed un

controllo isotopico. I grafici e le fotografie mostrano cellule colorate dopo 24 ore per (a) α -SMA, (b) EdU, (c) collagene, e (d) periostina per identificare i miofibroblasti e cellule altamente proliferative e quantificare la produzione di proteine di matrice extracellulare. La fluorescenza è stata quantificata sulla piattaforma Operetta per fino a 21 campi per condizione. Questo esperimento è stato ripetuto con fibroblasti derivati da individui diversi con risultati analoghi. In presenza di un anticorpo che blocca IL-11, fibroblasti stimolati da TGF β 1 hanno un rapporto diminuito di miofibroblasti, sono meno proliferativi ed esprimono meno collagene e periostina rispetto alle cellule di controllo. Ciò mostra che IL-11 è un componente essenziale del percorso di segnalazione di TGF β 1 che agisce in un modo di feed forward o alimentazione in avanti autocrino e/o paracrino e la sua inibizione riduce gli effetti pro-fibrotici di questo regolatore chiave della fibrosi in esseri umani.

Figura 4. La stimolazione di TGF β 1 sovra-regola IL-11 nei fibroblasti. I fibroblasti primari sono stati derivati da tessuto atriale umano da 80 individui ed incubati per 24 ore con e senza TGF β 1 (5 ng/ml). (a) Il grafico mostra che IL-11 era il trascritto di RNA più sovra-regolato in fibroblasti stimolati con TGF β 1 rispetto a 11.433 geni espressi (FPKM \geq 0,5) attraverso il genoma come valutato mediante profiling di trascrittoma globale. (b) Grafico che mostra l'espressione di IL-11 in fibroblasti umani primari non stimolati (TGF- β -) e stimolati (TGF- β ')

rispetto a tutti i tessuti umani come valutato mediante il progetto GTEx (Consortium, Gte. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. Science (New York, N.Y.), 348 (2015)) rivela alta specificità di livelli elevati di IL-11 rispetto a fibroblasti e fibroblasti specificatamente attivati, la cui firma non è apprezzata a livello dell'intero organo che contiene tipi cellulari multipli e pochi fibroblasti che esprimono IL-11.

Figura 5. IL-11 agisce come fattore autocrino su fibroblasti ed induce la sua propria espressione attraverso sola regolazione traduzionale. I fibroblasti primari sono stati stimolati con TGF- β per 24 ore. (a) Grafico che mostra che l'espressione di RNA di IL-11 aumentava significativamente (FDR = $9,1 \times 10^{-125}$) più di 8 volte in media attraverso 80 individui. (b) Grafico che mostra che i risultati di un'analisi ELISA confermano un aumento significativo di proteina IL-11 secreta da fibroblasti stimolati (t-test). (c) Grafico che mostra che l'incubazione di fibroblasti primari con IL-11 non fa aumentare i livelli di RNA di IL-11 (RT-qPCR). (d) Grafico che mostra che l'incubazione di fibroblasti primari con IL-11 induce secrezione di proteina IL-11 in modo significativo (Dunnett) come rivelato mediante ELISA. I valori P regolati sono dati come ****P < 0,0001.

Figura 6. IL-11 guida la proliferazione e l'attivazione dei fibroblasti nonché la produzione della matrice extracellulare ed è richiesta per la risposta fibrotica mediata da TGF β 1. I

fibroblasti cardiaci derivati da 3 individui sono stati incubati per 24 ore con TGF β 1 (5 ng/ml), IL-11 (5 ng/ml) o TGF β 1 e con un anticorpo IL-11/controllo di neutralizzazione. I grafici e le fotografie mostrano i risultati della colorazione di cellule in seguito ad incubazione per (a) contenuto di α -SMA per stimare la frazione dei miofibroblasti, (b) EdU per seguire le cellule proliferanti in modo attivo. (c) Periostina per stimare la produzione di ECM. La fluorescenza è stata misurata con la piattaforma Operetta per 14 campi attraverso 2 pozzetti per ciascun paziente. I grafici mostrano anche la secrezione di marcatori di fibrosi IL-6 (d), TIMP1 (e) e MMP2 (f) come valutato attraverso ELISA. La fluorescenza è stata normalizzata al gruppo di controllo senza stimolazione e la media con deviazione standard è rappresentata nel grafico. IL-11 induce una risposta fibrotica a livelli simili a TGF β 1 ed inibizione di IL-11 recupera il fenotipo TGF β 1 al livello di proteine. I valori P regolati sono dati come *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 o ****P < 0,0001 dei gruppi sperimentali rispetto a cellule non stimulate (Dunnett). I dati che cadono fuori dall'intervallo o outlier sono stati rimossi (ROUT, Q=2%).

Figura 7. IL-11 promuove la sintesi di proteina di collagene e stalla l'effetto pro-fibrotico di TGF β 1 a livello dell'RNA. Fibroblasti cardiaci derivati da 3 individui sono stati incubati per 24 ore con TGF β 1 (5 ng/ml), IL-11 (5 ng/ml) o TGF β 1 e con un anticorpo IL-11 di neutralizzazione. Dopo l'incubazione (a)

grafico che mostra i risultati in seguito ad incubazione di colorazione cellulare per collagene utilizzando l'analisi Operetta; la fluorescenza è stata quantificata come descritto sopra per la Figura 6, (b) grafico che mostra i livelli di collagene secreto valutati con colorazione Sirius Red, e (c) grafico che mostra i livelli di RNA di collagene misurati mediante RT-qPCR. IL-11 induce una risposta fibrotica a livelli simili a TGF β 1 solamente a livello proteico. L'espressione maggiore di trascritti di RNA di collagene mediante TGF β 1 non porta ad aumentata produzione di proteina se IL-11 era neutralizzata con un anticorpo. I valori di P regolati sono dati come *P < 0,05, ***P < 0,001 o ****P < 0,0001 dei gruppi sperimentali rispetto a gruppi di controllo di cellule non stimolate (Dunnett).

Figura 8. IL-11 è un marcatore di fibrosi ed attivatore attraverso tessuti multipli. L'espressione di IL-11 può essere indotta da un gruppo diverso di stimolanti pro-fibrotici a monte in aggiunta a TGF β 1. (a) Grafico che mostra l'effetto di TGF β 1 sull'espressione di IL-11; (b) grafico che mostra che ET-1 (endotelina) sovra-regola IL-11 in fibroblasti epatici e polmonari; (c) grafico che mostra che PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine) induce l'espressione di IL-11 in fibroblasti renali. I livelli di RNA di IL-11 sono stati misurati mediante RT-qPCR; i valori P regolati sono dati come *P < 0,05, **P < 0,01 o ****P < 0,0001 (Dunnett). Per esaminare l'effetto sistemico di IL-11, sola

soluzione salina (grigio) o IL-11 ricombinante (nero) sono state iniettate 6 volte alla settimana in topi C57BL/6 (200 µg/kg). Il contenuto di collagene nel tessuto è stato valutato mediante analisi di idrossiprolina (QuickZyme) al livello di proteine ed i risultati sono mostrati nel grafico (d). I tessuti di animali trattati con rIL-11 hanno maggiore contenuto di proteina di collagene rispetto ai controlli (ANOVA; $p=0,012$). (e) Fotografie di western blot che mostrano che i livelli di α -SMA sono aumentati nel rene e nel cuore di topi trattati con IL-11, il che indica la presenza di miofibroblasti.

Figura 9. Diagramma che illustra il ruolo di IL-11 come regolatore essenziale della risposta fibrotica. IL-11 è un regolatore essenziale richiesto per la risposta fibrotica. In risposta a danno ai tessuti o infiammazione cronica, le citochine come TGF β 1, ET-1 o PDGF vengono rilasciate per sovra-regolare la trascrizione dei geni marcatori della fibrosi. L'agente autocrino IL-11 viene quindi prodotto in risposta a questi stimoli a monte per garantire efficiente traduzione dei trascritti sovra-regolati in proteine rilevanti a livello funzionale in modo specifico per le cellule. L'inibizione di IL-11 blocca la sintesi della matrice extracellulare chiave e proteine di miofibroblasti e impedisce l'azione pro-fibrotica di un diverso gruppo di stimoli a monte.

Figura 10. L'inibizione di IL-11 arresta la sintesi di proteine di collagene in risposta a citochine pro-fibrotiche ANG2 (angiotensina II), PDGF ed ET-1. I fibroblasti cardiaci sono

stati incubati per 24 ore con ANG2, PDGF o ET-1 ed un anticorpo IL-11 neutralizzante. Dopo l'incubazione, le cellule sono state colorate per il collagene e la fluorescenza è stata quantificata. Questi stimoli inducono una risposta fibrotico a livello simile a TGF β 1. Tuttavia, l'espressione di collagene non era aumentata se IL-11 è neutralizzato con un anticorpo. I valori P sono dati come ****P < 0,0001 (t-test).

Figura 11. Sequenza nucleotidica di IL-11 umana, presa da GenBank numero di accessione gi|391353405|ref|NM_000614.3 (interleuchina 11 (IL-11) di Homo sapiens, variante 1 di trascritto Mrna) [SEQ ID NO:1]. La sequenza sottolineata codifica mRNA di IL-11. Le sequenze ombreggiate sono state utilizzate per la progettazione di siRNA knockdown di IL-11 e sono mostrate separatamente come SEQ ID NO:2-5. SEQ ID NO: 3 e 4 si sovrappongono fra di loro all'interno di SEQ ID NO:1.

Figura 12. La sequenza nucleotidica di IL-11R α umana, presa da Genbank numero di accessione gi|975336|gb|U32324.1|HSU32324 (mRNA di catena alfa del recettore di interleuchina 11 umana, cds completi) [SEQ ID NO:6]. La sequenza sottolineata codifica mRNA di IL-11R α . Le sequenze tratteggiate sono state utilizzate per la progettazione di siRNA knowdown di IL-11R α e sono mostrate separatamente come SEQ ID NO:7-10.

Figura 13. Tabella che mostra le sequenze di siRNA [SEQ ID NO:11-14] per il knockdown di IL-11.

Figura 14. Tabella che mostra le sequenze di siRNA [SEQ ID NO:15-

18] per il knockdown di IL-11R α .

Figura 15. Grafico che mostra knockdown di siRNA di IL-11R α in cellule HEK.

Figura 16. Grafico che mostra la profondità di lettura per l'intera sequenza di trascrittoma di fibroblasti atriali umani da 160 individui con e senza stimolazione con TGF β 1.

Figura 17. Grafico che mostra l'espressione di geni marcatori endoteliali, cardiomiociti e fibroblasti come determinato mediante RNA-seq del tessuto di origine (campioni di tessuti atriali umani, n=8) e colture di fibroblasti non stimolate primarie. (A) PECAM1, (B) MYH6, (C) TNNT2, (D) COL1A2, ed (E) ACTA2.

Figura 18. Grafici che mostrano la sovra-regolazione della espressione di IL-11 in fibroblasti in risposta alla stimolazione con TGF β 1. (A e B) Grafici che mostrano la variazione in numero di volte dell'espressione di geni nella fibrosi; IL-11 è il gene maggiormente sovra-regolato in risposta al trattamento con TGF β 1. (C) secrezione di IL-11 da parte di fibroblasti in risposta alla stimolazione con TGF β 1. (D) Confronto dell'espressione del gene di IL-11 in tessuti di individui sani ed in fibroblasti atriali, con o senza stimolazione con TGF β 1. (E) Corrispondenza del numero di volte di variazione dell'espressione di IL-11 determinata mediante RNA-seq rispetto a qPCR.

Figura 19. Grafici che mostrano l'induzione della secrezione di IL-11 in fibroblasti primari da parte di varie citochine pro-

fibrotiche, come determinato mediante ELISA. **(A)** TGF β 1, ET-1, AngII, PDGF, OSM ed IL-13 inducono la secrezione di IL-11 ed IL-11 induce anche l'espressione di IL-11 in un loop di feedback positivo. **(B)** Grafico che mostra che ELISA rivela solamente IL-11 nativa secreta dalle cellule e non rivela IL-11 ricombinante utilizzata per la condizione della stimolazione di IL-11. **(C)** e **(D)** Le cellule sono state stimolate con IL-11 ricombinante, l'RNA di IL-11 è stato misurato ed il livello di proteina di IL-11 nativa è stato misurato nel surnatante di coltura cellulare mediante ELISA agli istanti di tempo indicati.

Figura 20. Grafici ed immagini che mostrano la generazione di miofibroblasti da, e la produzione di ECM ed espressione di citochine da parte di, fibroblasti atriali in risposta alla stimolazione con TGF β 1 o con IL-11. **(A)** Generazione di miofibroblasti e produzione di ECM da parte di fibroblasti atriali primari in seguito a stimolazione con TGF β 1 o con IL-11, misurata mediante microscopia a fluorescenza dopo colorazione per α -SMA, collagene o periostina. **(B)** Contenuto di collagene del surnatante di coltura cellulare determinato mediante colorazione Sirius Red. Secrezione dei marcatori della fibrosi **(C)** IL-6, **(D)** TIMP1 ed **(E)** MMP2 misurata mediante ELISA. **(F)** Attivazione di fibroblasti murini mediante stimolazione con IL-11 ricombinante umana o murina, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 [Media \pm SD, Dunnett].

Figura 21. Grafici che mostrano l'effetto pro-fibrotico di IL-11.

(A) Fibroblasti di topo da diversi tessuti di origine possono essere attivati mediante IL-11 e presentano aumentata produzione di ECM. [Media \pm SD, Dunnett]. Iniezione di topi con IL-11 ricombinante o AngII dà come risultato (B) aumento del peso degli organi [media \pm SEM] e (C) aumento del contenuto di collagene (come determinato mediante analisi HPA). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 [media \pm SD, Dunnett].

Figura 22. Grafici ed immagini che mostrano che IL-11 è necessario per gli effetti pro-fibrotici di TGF β 1 sui fibroblasti.

(A) Generazione di miofibroblasti e produzione di ECM da parte di fibroblasti atriali primari, con o senza stimolazione con TGF β 1 ed in presenza/assenza di anticorpo anti-IL-11 neutralizzante o IgG di controllo isotipico, come misurato mediante microscopia a fluorescenza in seguito a colorazione per (A) α -SMA, (B) EdU o (C) periostina. (D-F) Secrezione dei marcatori della fibrosi (D) IL-6, (E) TIMP1, e (F) MMP2 è stata analizzata mediante ELISA. La fluorescenza è stata normalizzata per il gruppo di controllo senza stimolazione. [Media \pm SD, Dunnett] *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 o ****P < 0,0001.

Figura 23. Grafici ed immagini che mostrano l'effetto della neutralizzazione di IL-11 sulla produzione di collagene innestata da TGF β 1. La produzione di collagene da parte di fibroblasti cardiaci con o senza stimolazione con TGF β 1 ed in presenza/assenza di anticorpo anti-IL-11 di neutralizzazione o IgG di controllo isotipico, come determinato mediante (A) analisi

Operetta o **(B)** colorazione con Sirius Red. [Media \pm SD, Dunnett]

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 o ****P < 0,0001.

Figura 24. Grafici che mostrano la capacità di vari antagonisti di IL-11 ed IL-11R α di inibire la fibrosi. Fibroblasti atriali umani sono stati trattati con anticorpo neutralizzante contro IL-11, anticorpo neutralizzante contro IL-11R α , molecola di recettore decoy di IL-11 che si lega ad IL-11, siRNA che sotto-regola l'espressione di IL-11 o siRNA che sotto-regola l'espressione di IL-11RA ed è stato analizzato l'effetto sulla risposta pro-fibrotica guidata da TGF β 1 nei fibroblasti *in vitro*. [Media \pm SD, Dunnett] *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 o ****P < 0,0001.

Figura 25. Grafici a barra che mostrano la risposta di fibroblasti da topi knockout IL-11RA al trattamento pro-fibrotico. Fibroblasti derivati da topi IL-11RA WT (+/+), eterozigoti (+/-) ed omozigoti nulli (-/-) sono stati incubati per 24 ore con TGF β 1, IL-11 o AngII (5 ng/ml). **(A)** Percentuale di miofibroblasti come determinata mediante analisi del contenuto di α -SMA, **(B)** percentuale di cellule proliferanti come determinata mediante colorazione per EdU, **(C)** contenuto di collagene, e **(D)** produzione di ECM come misurata mediante rivelazione di periostina [Media \pm SD].

Figura 26. Grafici che mostrano l'effetto della neutralizzazione di IL-11 sulla fibrosi in risposta a vari stimoli pro-fibrotici. I fibroblasti sono stati coltivati *in vitro* in presenza/assenza

di vari differenti fattori pro-fibrotici differenti ed in presenza/assenza di anticorpo anti-IL-11 neutralizzante o anticorpo pan anti-TGF β 1 (A) produzione di collagene e (B) generazione di miofibroblasti come determinata mediante analisi dell'espressione di α -SMA. [Media \pm SD, Dunnett] *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 o ****P < 0,0001.

Figura 27. Grafici a barra che mostrano l'espressione di marcatori di fibrosi nell'atrio e nel cuore di animali WT e IL-11RA (-/-) in seguito a trattamento con trattamento con AngII. (A) Contenuto di collagene, come misurato mediante analisi di idrossiprolina. (B) Espressione di collagene (CollA2). (C) Espressione di α SMA (ACTA2). (D) Espressione di fibronectina (Fn1).

Figura 28. Grafici che mostrano l'effetto di knockout di IL-11RA su fibrosi renale indotta da folata come misurato mediante contenuto di collagene in tessuto renale.

Figura 29. Schema delle procedure sperimentali per l'analisi di fibrosi in (A) polmone, (B) pelle e (C) occhio per topi IL-11RA -/- rispetto a topi IL-11RA +/+.

Figura 30. Diagrammi di scattering che mostrano il numero di volte di variazione nell'espressione di geni. (A) Numero di volte di variazione nell'espressione genica di fibroblasti in seguito a stimolazione con TGF β 1, IL-11 o TGF β 1 ed IL-11. (B) Numero di volte di variazione nell'espressione genica in fibroblasti ottenuti da topi IL-11RA+/+ e IL-11RA-/- in seguito a stimolazione con TGF β 1.

Figura 31. Fotografie che mostrano l'effetto di knockout di IL-11RA sulla cicatrizzazione di ferite e fibrosi nell'occhio in seguito a trabecolectomia (chirurgia di filtrazione). **(A)** Sezione dell'occhio di animali IL-11RA+/+ (WT) e IL-11RA-/- (KO) 7 giorni dopo la chirurgia di filtrazione. **(B)** Maturazione di fibre di collagene come valutato mediante la tecnica di colorazione picrosirius red/luce di polarizzazione (Szendrői et al., 1984, Acta Morph. Hung, 32, 47-55); viene osservata più fibrosi in topi WT che non in topi KO.

Figura 32. Grafici che mostrano l'effetto di recettori decoy IL-11 sulla fibrosi in risposta alla stimolazione con TGF β 1. I fibroblasti sono stati coltivati *in vitro* in presenza/assenza di TGF β 1 (5 ng/ml), in presenza o assenza di **(A)** D11R1 (Decoy Receptor 50aa Linker o Linker da 50aa del Recettore Decoy) o **(B)** D11R2 (Decoy Receptor 33aa Linker o Linker da 33aa del Recettore Decoy), a varie concentrazioni differenti. La generazione di miofibroblasti dopo 24 ore (cioè la percentuale di fibroblasti attivati) è stata determinata mediante analisi dell'espressione di α -SMA.

Figura 33. Tabella che mostra la regolazione degli SNP di IL-11 VST_{stim} in *trans*.

Figura 34. Tabella che mostra la regolazione degli SNP di IL-11 VST_{stim} - VST_{unstim} in *cis*.

Figura 35. Tabella che mostra la regolazione di SNP degli di IL-11 VST_{stim} - VST_{unstim} in *trans*.

Figure 36A, 36B, 36C e 36D. Grafici che mostrano la regolazione della risposta di IL-11 da parte di SNP locali. L'RNA di fibroblasti non stimolati e stimolati (TGF β 1, 5 ng/ml, 24 ore) derivato da 69 individui genotipizzati è stato sequenziato. I campioni sono stati raggruppati a seconda del genotipo e l'aumento di espressione di IL-11 ($VST_{stim} - VST_{unstim}$) è stato confrontato fra gruppi con 0, 1 o 2 alleli minori.

Figura 37. Grafici che mostrano la regolazione della risposta di IL-11 da parte di SNP distanti. L'RNA di fibroblasti non stimolati e stimolati (TGF β 1, 5 ng/ml, 24 ore) derivato da 69 individui genotipizzati è stato sequenziato. I campioni sono stati raggruppati a seconda del genotipo e l'aumento di espressione di IL11 ($VST_{stim} - VST_{unstim}$) è stato confrontato fra gruppi con 0 o 1 allele minore.

Figure 38A, 38B, 38C e 38D. Grafici che mostrano che IL-11 è richiesta per gli effetti pro-fibrotici di TGF β 1 in fibroblasti di fegato. L'attivazione e la proliferazione di fibroblasti epatici umani primari, con o senza stimolazione con TGF β 1 ed in presenza/assenza di un anticorpo anti-IL-11 di neutralizzazione o IgG di controllo isotipico, come misurata mediante analisi della proporzione di **(A)** cellule positive a α -SMA, **(B)** cellule positive ad EdU, **(C)** cellule positive a collagene, e **(D)** cellule positive a periostina rispetto a cellule non stimolate (linea basale). [Media \pm SD, Dunnett] *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 o ****P < 0,0001.

Figura 39. Grafico a barre che mostra che IL-11 è richiesta per gli effetti pro-fibrotici di TGF β 1 in fibroblasti della pelle. L'attivazione di fibroblasti di pelle di topo, con o senza stimolazione con TGF β 1 ed in presenza/assenza di anticorpo anti-IL-11 di neutralizzazione, come misurata mediante analisi della percentuale di cellule positive a α -SMA (fibroblasti attivati).

Figura 40. Grafico a barre che mostra la migrazione delle cellule di fibroblasti di polmone con e senza segnalazione di IL-11. La migrazione dei fibroblasti del polmone da animali IL-11RA+/+ (WT) ed IL-11RA-/- (KO) è stata analizzata in un'analisi di striscio *in vitro* senza stimolo o in presenza di TGF β 1 o IL-11.

Esempi

Esempio 1

La risposta fibrotica è caratterizzata da diffuse variazioni molecolari in fibroblasti residenti attivati. Per stabilire il ruolo di IL-11 come un marcatore chiave di questa transizione, abbiamo valutato e classificato differenze di espressione di RNA globali in fibroblasti atriali derivati da 80 individui prima e 24 ore dopo l'attivazione del fattore di crescita di trasformazione beta-1 (TGF β 1). Abbiamo coltivato fibroblasti primari derivati dall'atrio di 80 individui che avevano subito intervento chirurgico cardiaco per malattia delle arterie coronarie. I fibroblasti sono stati studiati *ex vivo* alla linea basale e dopo stimolazione con TGF β 1 (un potente stimolo pro-fibrotico) utilizzando profiling di espressione a livello dell'intero genoma (RNA-Seq) combinato con analisi fenotipiche e

genotipizzazione.

L'espressione di IL-11 era indotta in misura significativa in risposta al trattamento con TGF β 1 con livelli di RNA che aumentavano di ben 30x (> 8x in media). L'espressione di IL-11 era maggiore dell'espressione di tutti gli altri geni individuali (Figure 1a,b), il che significa che ~11.500 geni espressi in fibroblasti IL-11 erano piú nettamente sovra-regolati. La sovra-regolazione di IL-11 è stata confermata mediante RT-qPCR nonché con esperimenti ELISA (Figure 1c,d), il che indica che la produzione ed il rilascio aumentati di proteina IL-11 in fibroblasti attivati sono il motore principale della fibrosi.

Per valutare se IL-11 agisce come un fattore di segnalazione autocrino che guida la fibrosi, abbiamo incubato fibroblasti atriali non stimolati con IL-11 e monitorato la proliferazione delle cellule, generazione di miofibroblasti, nonché espressione di collagene e periostina a livello proteico. Abbiamo osservato un aumento di produzione di collagene, di proliferazione cellulare e di espressione di periostina a livelli simili a quelli indotti dal percorso di segnalazione di TGF β 1. Fibroblasti attivati da IL-11 inoltre si differenziavano in miofibroblasti α -SMA+ (Figura 2).

In aggiunta alla sua funzione pro-fibrotica, si è trovato che IL-11 gioca un ruolo critico nella risposta fibrotica indotta da TGF β 1 stessa. L'inibizione di IL-11 con un anticorpo monoclonale anti-IL-11 umano di neutralizzazione (IgG_{2A} murina monoclonale; Clone #22626; catalogo N. MAB218; R&D Systems, MN, USA) riduceva

l'attivazione dei fibroblasti attraverso TGF β 1. Cellule incubate con TGF β 1 non generavano più proteine di matrice extracellulare quando l'anticorpo per IL-11 era presente (Figura 3).

Abbiamo mostrato che gli anticorpi di neutralizzazione per IL-11 impediscono l'attivazione di fibroblasti indotta da TGF β 1.

Esempio 2

L'infiammazione ed il danno ai tessuti stimolano un processo dinamico che implica il reclutamento, la proliferazione e l'attivazione dei fibroblasti per generare una matrice extracellulare ed iniziare il risanamento di una ferita e la formazione di cicatrici. Questa risposta fibrotica è caratterizzata da diffusi cambiamenti molecolari nei fibroblasti residenti attivi, che può essere indotta da TGF β 1, una citochina multifunzionale che viene rilasciata da cellule locali ed infiltranti.

Per identificare marcatori chiave di questa transizione, abbiamo valutato e classificato le differenze di espressione di RNA globale attraverso il sequenziamento di trascrittoma in fibroblasti atriali derivati da 80 individui prima e 24 ore dopo trattamento con TGF β 1. Come discusso nell'Esempio 1, l'espressione di IL-11 era significativamente sovra-regolata in fibroblasti attivati e abbiamo mostrato per la prima volta che la risposta trascrizionale di IL-11 è maggiore della risposta trascrizionale di tutti gli altri geni individuali regolati nella fibrosi (Figura 4a). Il confronto del livello di espressione di IL-11 nel nostro sistema di modello con vari tessuti umani indicava che i livelli di IL-11 alti erano pure

estremamente specifici per la risposta fibrotica (Figura 4b), il che li rende un marcatore ideale per valutare la misura della fibrosi nel corpo umano.

Per valutare ulteriormente se IL-11 agisce come un fattore di segnalazione autocrino che guida la fibrosi, abbiamo confermato che una sovra-regolazione di RNA di IL-11 (Figura 5a) porta ad un aumento della secrezione di IL-11 (Figura 5b) da fibroblasti atriali. L'incubazione di fibroblasti con IL-11 non aumentava l'espressione di RNA di IL-11 (Figura 5c), ma portava ad un aumento della secrezione di IL-11 dalle cellule (Figura 5d). Ciò mostra che IL-11 ha un effetto autocrino sui fibroblasti che regola la produzione della proteina di IL-11 a livello traduzionale.

Abbiamo quindi incubato fibroblasti atriali con TGF β 1, con IL-11 ricombinante o con TGF β 1 e con un anticorpo monoclonale anti-IL-11 umano neutralizzante (IgG2A monoclonale murina; Clone #22626; catalogo N. MAB218; R&D Systems, MN, USA) e monitorato la proliferazione cellulare, la generazione di miofibroblasti, nonché l'espressione di periostina a livello proteico. Abbiamo osservato un aumento di fibroblasti attivati (cellule positive a α -SMA), produzione di periostina e proliferazione cellulare ad un livello simile sia per fibroblasti stimolati da TGF β 1 che da IL-11. In aggiunta alla sua funzione pro-fibrotica, si è trovato che IL-11 gioca inoltre un ruolo critico nella fibrosi da TGF β 1 stessa. L'effetto pro-fibrotico di TGF β 1 era inibito quando abbiamo neutralizzato IL-11 con l'anticorpo (Figure 6a-c). Lo stesso schema è

stato osservato quando abbiamo monitorato la secrezione di marcatori di fibrosi come IL6, MMP2 e TIMP1 (Figure 6d-f).

Abbiamo quindi monitorato la deposizione di collagene, il contrassegno patognomonico della risposta fibrotica, utilizzando una pluralità di analisi attraverso diversi livelli regolatori della espressione genica. Si è trovato che TGF β 1 aumenta il collagene intracellulare (Figura 7a), il collagene secreto (Figura 7b), nonché i livelli di RNA di collagene (Figura 7c), come previsto. La risposta a IL-11 veniva osservata solamente a livello proteico (Figure 7a,b) e non a livello dell'RNA (Figura 7c). La stimolazione con TGF β 1 in parallelo all'inibizione di IL-11 ha portato ad un aumento di RNA di collagene ma quest'effetto guidato da TGF β 1 non veniva portato a livello delle proteine.

Per stabilire ulteriormente il ruolo centrale di IL-11 nella fibrosi a valle dello stimolo pro-fibrotico multiplo, abbiamo valutato l'espressione di IL-11 attraverso popolazioni di fibroblasti derivati da quattro diversi tessuti in risposta a TGF β 1 (Figura 8a), ET-1 (Figura 8b) e PDGF (Figura 8c). Abbiamo somministrato inoltre IL-11 ricombinante in modo sistemico a topi C57BL/6 e monitorato l'espressione di collagene e di α SMA. La produzione di collagene era aumentata attraverso rene, cuore e fegato (Figura 8d) e abbiamo rivelato anche più fibroblasti attivati nel cuore e rene, indicati da maggiori livelli di proteina α SMA (Figura 8e).

Le nostre scoperte dimostrano un nuovo ruolo centrale per IL-11 nella fibrosi ed in modo estremamente importante, mostrano che IL-11

è a valle degli stimoli pro-fibrotici chiave attraverso diversi tessuti. Questi risultati mostrano che IL-11 è necessario per TGF β 1 per procedere dalla regolazione trascrizionale alla traduzione delle proteine. L'inibizione di IL-11 stalla l'effetto pro-fibrotico di TGF β 1 sul trascrittoma (Figura 9).

Esempio 3: Gli anticorpi anti-IL-11 inibiscono gli stimoli pro-fibrotici

In esperimenti analoghi a quelli descritti rispetto alla Figura 3c, fibroblasti atriali sono stati esposti ad altri stimoli pro-fibrotici sotto forma di angiotensina II (ANG 2), fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) ed endotelina 1 (ET-1) ed è stata misurata la produzione di collagene.

In aggiunta all'induzione dell'espressione di mRNA di IL-11, ciascuno di ANG2, PDGF ed ET-1 induceva l'espressione di proteina IL-11. L'inibizione di IL-11 con un anticorpo monoclonale anti-IL-11 umano neutralizzante (IgG_{2A} monoclonale murina; clone #22626; catalogo N. MAB218; R&D Systems, MN, USA) bloccava l'effetto pro-fibrotico di ciascuno di questi stimoli pro-fibrotici (Figura 10) indicando che IL-11 è l'effettore centrale degli stimoli pro-fibrotici maggiori (TGF β 1, ANG2, PDGF ed ET-1).

Esempio 4: knockdown di IL-11R

Cellule HEK sono state transfettate (24 ore) con siRNA non bersagliante (NT) o uno di quattro diversi siRNA contro il recettore di IL11RA1 (siRNA 5-8; Figura 14; SEQ ID NO:15-18). L'RNA è stato estratto ed analizzato per l'espressione di RNA di IL11RA1 mediante

qPCR. I dati sono mostrati nella Figura 15 come livelli di espressione di mRNA rispetto al controllo (NT).

Esempio 5: Ruolo di IL-11 nella fibrosi

5.1 IL-11 è sovra-regolato nella fibrosi

Per comprendere i processi molecolari alla base della transizione di fibroblasti a miofibroblasti attivati, tessuto atriale è stato ottenuto da più di 200 pazienti che avevano subito intervento chirurgico di bypass cardiaco presso il National Heart Centre Singapore. Le cellule sono state coltivate *in vitro* ad un basso passaggio (<4 passaggi) e o non stimolate o stimolate con TGF β 1 per 24 ore. Abbiamo successivamente compiuto analisi di sequenziamento di RNA ad alta resa (RNA-seq) di fibroblasti non stimolati e cellule stimolate con stimolo pro-fibrotico prototipo TGF β 1 in 160 individui; la profondità di lettura media era di ~70M per campione (paired-end 100 bp; Figura 16).

Per garantire la purezza delle colture di cellule di fibroblasti atriali, abbiamo analizzato l'espressione di geni marcatori di cellule endoteliali, cardiomiociti e tipo di cellule di fibroblasti dall'atrio (Hsu et al., 2012, *Circulation Cardiovasc. Genetics*, 5, 327-335) nel gruppo di dati RNA-seq.

I risultati sono mostrati nelle Figure 17A-17E e confermano la purezza delle colture di fibroblasti atriali.

L'espressione genica è stata analizzata mediante RNA-seq del tessuto di origine (campioni di tessuto atriali umani n=8) e colture di fibroblasti non stimolate primarie. L'espressione nulla/

estremamente bassa di marcatori di cellule endoteliali PECAM1 (Figura 17A) e marcatori di cardiomiociti MYH6 (Figura 17B) e di TNNT2 (Figura 17C) è stata rivelata in campioni di coltura di cellule di fibroblasti.

I marcatori per fibroblasti COL1A2 (Figura 17D) ed ACTA2 (Figura 17E) erano altamente espressi rispetto al tessuto di origine.

Quindi, i dati di RNA-seq sono stati analizzati per identificare i geni la cui espressione era aumentata o diminuita in seguito a stimolazione con TGF β 1 e quest'informazione è stata integrata con il grosso gruppo di dati di RNA-seq attraverso 35+ tessuti umani forniti dal progetto GTEx (The GTEx Consortium, 2015, Science, 348, 648-660). Ciò ha consentito l'identificazione delle firme di espressione genica che erano specifiche per la transizione fibroblasti-miofibroblasti.

I risultati sono mostrati nelle Figure 18A-18E. Attraverso i 10000+ geni espressi nei fibroblasti, IL-11 era il gene più fortemente sovra-regolato in risposta alla stimolazione con TGF β 1 ed in media attraverso i 160 individui era sovra-regolato di più di 10 volte (Figura 18A).

La sovra-regolazione dell'espressione di IL-11 è stata confermata mediante analisi ELISA del surnatante di coltura cellulare di fibroblasti stimolati con TGF β 1 (Figura 18C). rispetto al livello di espressione di IL-11 in altri tessuti di individui sani, questa risposta si è osservato che era altamente specifica a fibroblasti attivati (Figura 18D). Variazioni di vari numeri di volte della espressione di RNA di IL-11 è stata pure confermata mediante analisi

qPCR (Figura 18E).

Quindi, i fibroblasti sono stati coltivati *in vitro* e stimolati con diversi altri fattori pro-fibrotici noti: ET-1, ANII, PDGF, OSM ed IL-13 ed anche con IL-11 ricombinante umana. Per l'analisi della sovra-regolazione di IL-11 prodotta in risposta a stimolazione con IL-11, si è confermato che ELISA era in grado di rivelare solamente IL-11 nativa secreta dalle cellule e non rivelava IL-11 ricombinante utilizzata per le stimolazioni (Figura 19B).

I risultati sono mostrati in Figura 19A. Si è trovato che ciascun fattore induce in misura significativa la secrezione di IL-11 da fibroblasti. Viene mostrato che IL-11 agisce in un loop autocrino nei fibroblasti, cosa che può dare come risultato sovra-regolazione della proteina IL-11 di ben 100 volte dopo 72 ore (Figura 19D).

In modo interessante, questo loop autocrino per IL-11 è simile alla produzione autocrina di IL-6. IL-6 è della medesima famiglia di citochine e pure compie segnalazione attraverso il recettore di gp130 (Garbers e Scheller, 2013, Biol. Chem., 394, 1145-1161), che è stato proposto garantire sopravvivenza e crescita continuata di cellule di cancro al polmone ed alla mammella (Grivennikov e Karin, 2008, Cancer Cell, 13, 7-9).

Nessun aumento del livello di RNA di IL-11 è stato rivelato in risposta alla stimolazione con IL-11 (Figura 19D). A differenza di TGF β 1, che aumenta l'espressione di IL-11 sia a livello di RNA che di proteine, pertanto, sembra che IL-11 regoli verso l'alto l'espressione di IL-11 solamente a livello post-trascrizionale.

5.2 IL-11 ha un ruolo pro-fibrotico nella fibrosi di tessuto cardiaco

Per esplorare se la produzione autocrina di IL-11 sia pro- o anti-fibrotica, i fibroblasti sono stati coltivati *in vitro* con IL-11 ricombinante e la frazione di miofibroblasti (cellule positive a α SMA) ed è stata analizzata la produzione di matrice extracellulare.

L'espressione di α SMA, collagene e periostina è stata monitorata con il sistema Operetta di acquisizione di immagini ad alto contenuto in un modo automatizzato ad alta resa. In parallelo, la secrezione di proteine marcatrici di fibrosi come MMP2, TIMP1 ed IL-6 è stata analizzata mediante analisi ELISA ed i livelli di collagene sono stati confermati mediante analisi colorimetrica Sirius Red del surnatante di coltura cellulare.

In breve, fibroblasti atriali derivati da 3 individui sono stati incubati in 2 pozzetti ciascuno per 24 ore senza stimolazione, con TGF β 1 (5 ng/ml) o con IL-11 (5 ng/ml). Dopo l'incubazione, le cellule sono state colorate per analizzare il contenuto di α -SMA per stimare la frazione di miofibroblasti e per collagene e periostina per stimare la produzione di ECM. La fluorescenza è stata misurata in 7 campi per pozzetto. Il surnatante di 2 pozzetti per individuo è stato pure valutato per il contenuto di collagene mediante colorazione Sirius Red. Il segnale è stato normalizzato al gruppo di controllo senza stimolazione. La secrezione di marcatori della fibrosi IL-6, TIMP1 e MMP2 è stata analizzata mediante ELISA.

I risultati sono mostrati nelle Figure 20A-20F. Fibroblasti attivati da TGF β 1 e produzione aumentata di ECM (Figura 20A).

Inaspettatamente e in contrasto con il ruolo anti-fibrotico descritto per IL-11 nel tessuto cardiaco nella letteratura scientifica, IL-11 ricombinante provocava un aumento nella frazione di miofibroblasti in colture di fibroblasti e promuoveva anche la produzione di collagene di proteine di matrice extracellulare e periostina nella medesima misura di TGF β 1 (Figura 20A). Sia IL-11 che le citochine TGF β 1 inoltre aumentava significativamente la secrezione di marcatori pro-fibrotici IL-6, TIMP1 e MMP2 (Figure da 20B a 20E) e ad un livello simile.

Gli inventori hanno ipotizzato che la contraddizione fra la presente scoperta che IL-11 è pro-fibrotico nel tessuto cardiaco ed il ruolo anti-fibrotico descritto in letteratura, potrebbe essere correlata all'uso di IL-11 umana in roditori in quegli studi precedenti (Obana et al., 2010, 2012; Stangou et al., 2011; Trepicchio e Dorner, 1998).

Per esaminare questa ipotesi, diluizioni seriali di IL-11 sia umana che murina sono state compiute e l'attivazione di fibroblasti atriali umani è stata monitorata (Figura 20F). Non si è osservata alcuna attivazione dei fibroblasti a basse concentrazioni di IL-11 umana su cellule murine, il che suggerisce che le precedenti intuizioni sulla funzione di IL-11 fossero in parte dovute a osservazioni non specifiche per IL-11.

5.3 IL-11 ha un ruolo pro-fibrotico nella fibrosi di una varietà di tessuti

Per testare se l'azione pro-fibrotica di IL-11 fosse specifica per i fibroblasti atriali, fibroblasti umani derivati da diversi

tessuti differenti (cuore, polmone, pelle, rene e fegato) sono stati coltivati *in vitro*, stimolati con IL-11 umana e l'attivazione dei fibroblasti e la produzione di ECM sono state analizzate come descritto sopra. Aumentata attivazione di fibroblasti e produzione di ECM sono state osservate rispetto a colture non stimolate di fibroblasti derivati da ciascuno dei tessuti analizzati.

5.3. Fibrosi epatica

Per testare se la segnalazione di IL-11 è importante nella fibrosi epatica, fibroblasti epatici primari umani (Cell Biologics, Cat. # H-6019) sono stati coltivati a basso passaggio in pozzetti di piastre da 96 pozzetti e o non stimolati, stimolati con TGF β 1 (5 ng/ml, 24 ore), con IL-11 (5 ng/ml, 24 ore) o incubati sia con TGF β 1 (5 ng/ml) che con un anticorpo per IL-11 neutralizzante (2 μ g/ml) o per TGF β 1 (5 ng/ml) e con un anticorpo di controllo isotipico. L'attivazione di fibroblasti (cellule positive ad α SMA), la proliferazione di cellule (cellule positive ad EdU) e la produzione di ECM (periostina e collagene) sono state analizzate utilizzando la piattaforma Operetta.

I risultati degli esperimenti con fibroblasti epatici umani primari sono mostrati nelle Figure 38A-38D. Si è trovato che IL-11 attivava i fibroblasti epatici e la segnalazione di IL-11 è stata trovata necessaria per l'azione pro-fibrotica di TGF β 1 in fibroblasti di fegato o epatici. Sia l'attivazione che la proliferazione di fibroblasti era inibita dall'anticorpo anti-IL-11 neutralizzante.

5.3.2 Fibrosi della pelle

Per testare se la segnalazione di IL-11 è importante nella fibrosi della pella, i fibroblasti di pelle di topo primari sono stati coltivati a bassi passaggi in pozzetti di piastre da 96 pozzetti e o non stimolati, stimolati con TGF β 1 (5 ng/ml, 24 ore) o incubati per 24 ore sia con TGF β 1 (5 ng/ml) che con un anticorpo per IL-11 di neutralizzazione (2 μ g/ml). L'attivazione dei fibroblasti (cellule positive a α SMA) è stata quindi analizzata utilizzando la piattaforma Operetta.

I risultati sono mostrati in Figura 39. L'attivazione mediata da TGF β 1 di fibroblasti della pelle era inibita dall'anticorpo anti-IL-11 di neutralizzazione.

5.3.3 Fibrosi in organi multipli

Quindi, IL-11 ricombinante murina è stata iniettata (100 μ g/kg, 3 giorni/settimana, 28 giorni) nei topi per testare se IL-11 potesse guidare la fibrosi dei tessuti globali *in vivo*.

I risultati sono mostrati in Figura 21. Rispetto all'iniezione di AngII (una citochina che provoca l'innalzamento della pressione del sangue ed ipertrofia del cuore), IL-11 pure aumentava il peso del cuore, ma anche il peso di rene, polmone e fegato, rispetto al peso corporeo (Figura 21B). La valutazione del contenuto di collagene in questi tessuti mediante analisi di idrossiprolina ha rivelato una sovra-regolazione della produzione di collagene in questi tessuti, indicando fibrosi poiché probabilmente provocano l'aumento del peso dell'organo (Figura 6C). L'espressione di geni marcatori di fibrosi ACTA2 (= α SMA), Coll1a1, Col3a1, Fn1, Mmp2 e Timp1 è stata anche

rivelata mediante analisi qPCR di RNA isolato dai tessuti di cuore, rene, polmone e fegato di questi animali.

Esempio 6: Potenziale terapeutico dell'antagonismo di IL-11/IL-11R

6.1. Inibizione della risposta fibrotica utilizzando antagonisti neutralizzanti di IL-11/IL-11R

Quindi è stato investigato se il loop autocrino della secrezione di IL-11 fosse necessario per l'effetto pro-fibrotico di TGF β 1 sui fibroblasti.

IL-11 è stato inibito utilizzando un anticorpo di neutralizzazione disponibile in commercio (IgG_{2A} monoclonale murina; clone #22626; catalogo N. MAB218; R&D Systems, MN, USA). I fibroblasti sono stati trattati con TGF β 1 in presenza o in assenza dell'anticorpo e sono state misurate l'attivazione di fibroblasti, la proporzione di cellule proliferanti e la produzione di ECM e marcatori della risposta fibrotica.

In breve, fibroblasti atriali derivati da 3 individui sono stati incubati per 24 ore con TGF β 1 (5 ng/ml) o con TGF β 1 in presenza di un anticorpo anti-IL-11 di neutralizzazione o anticorpo di controllo isotipico. Dopo l'incubazione, le cellule sono state colorate per α SMA per determinare la frazione di miofibroblasti, la proporzione di cellule proliferanti è stata determinata mediante analisi della incorporazione di EdU e la periostina è stata misurata per determinare la produzione di ECM. La fluorescenza è stata misurata con la piattaforma Operetta per 14 campo attraverso 2 pozzetti per ciascun individuo. La secrezione di marcatori di fibrosi IL-6, TIMP1

e MMP2 è stata pure analizzata ELISA. La fluorescenza è stata normalizzata al gruppo di controllo senza stimolazione.

I risultati sono mostrati nelle Figure da 22A a 22F. Si è trovato che l'inibizione di IL-11 migliora la fibrosi indotta da TGF β 1 e si è mostrato che IL-11 è essenziale per l'effetto profibrotico di TGF β 1. Si è trovato che l'inibizione di IL-11 "recupera" il fenotipo di TGF β 1 a livello proteico.

È stata anche analizzata la produzione di collagene. Fibroblasti cardiaci derivati da 3 individui sono stati incubati per 24 ore con TGF β 1 (5 ng/ml) o con TGF β 1 e con un anticorpo per IL-11 neutralizzante. Dopo l'incubazione, le cellule sono state colorate per collagene utilizzando l'analisi Operette e la fluorescenza è stata quantificata come descritto in precedenza. I livelli di collagene secreto nel surnatante di coltura cellulare sono stati valutati mediante colorazione Sirius Red.

I risultati sono mostrati nelle Figure 23A e 23B e confermano l'effetto anti-fibrotico dell'inibizione di IL-11 utilizzando un anticorpo di neutralizzazione.

Quindi, la capacità di diversi altri antagonisti di IL-11/IL-11R di inibire la fibrosi è stata analizzata *in vitro* utilizzando fibroblasti atriali, analisi di transizione di miofibroblasti indotta da TGF β 1 come descritto qui in precedenza.

In breve, cellule di fibroblasti atriali umani sono state coltivate *in vitro*, stimulate per 24 ore con TGF β 1 (5 ng/ml) o lasciate non stimulate, in presenza/assenza di: (i) un anticorpo

anti-IL-11 di neutralizzazione, (ii) una proteina di fusione di IL-11 RA-gp130, (iii) un anticorpo anti-IL-11 RA di neutralizzazione, (iv) trattamento con siRNA diretto contro IL-11, o (v) trattamento con siRNA diretto contro IL-11RA. La proporzione di fibroblasti attivati (miofibroblasti) è stata analizzata valutando il contenuto di α SMA come descritto sopra.

I risultati sono mostrati nella Figura 24. Ciascuno degli antagonisti della segnalazione di IL-11/IL-11R è stato trovato in grado di abrogare la risposta pro-fibrotica mediata da TGF β 1.

Esempio 7: Conferma in vivo di un ruolo pro-fibrotico per la segnalazione di IL-11/IL-11R

7.1 Studi in vitro utilizzando cellule derivate da topi knock-out del gene IL-11RA

Tutti i topi sono stati allevati ed alloggiati nella medesima stanza e forniti a volontà di cibo ed acqua. I topi mancanti degli alleli funzionali per IL-11R α (topi KO per IL-11RA1) erano sullo sfondo genetico C57Bl/6. I topi erano di 9-11 settimane di età ed i pesi degli animali non differivano in modo significativo.

Per confermare ulteriormente l'effetto anti-fibrotico della inibizione della segnalazione di IL-11/IL-11RA, fibroblasti primari sono stati generati da topi knock-out del gene IL-11RA ed incubati con cellule di fibroblasti primari raccolti da animali IL-11RA+/+ (cioè di tipo selvatico), IL-11RA+/- (cioè eterozigoti knockout) ed IL-11RA-/- (cioè omozigoti knockout) con TGF β 1, IL-11 o AngII. Sono state analizzate l'attivazione e la proliferazione di fibroblasti e

la produzione di ECM.

I fibroblasti derivati da topi IL-11RA+/+, IL-11RA+/- e IL-11RA-/- sono stati incubati per 24 ore con TGF β 1, IL-11 o AngII (5 ng/ml). Dopo l'incubazione, le cellule sono state colorate per il contenuto di α SMA per stimare la frazione di miofibroblasti, per EdU per identificare la frazione di cellule proliferanti e per collagene e periostina per stimare la produzione di ECM. La fluorescenza è stata misurata utilizzando la piattaforma Operetta.

I risultati sono mostrati nelle Figure da 25A a 25D. Topi IL-11RA-/- sono stati trovati non rispondere a stimoli pro-fibrotici. Questi risultati suggeriscono che la segnalazione di IL-11 è pure necessaria per la fibrosi indotta da AngII.

Quindi, si è esaminato se questo valeva anche per altre citochine pro-fibrotiche. In breve, i fibroblasti sono stati coltivati *in vitro* in presenza/assenza di vari fattori pro-fibrotici diversi (ANG2, ET-1 o PDGF) ed in presenza/assenza di anticorpo anti-IL-11 di neutralizzazione o anticorpo pan anti-TGF β . Dopo 24 ore, la produzione di collagene da parte delle cellule è stata determinata mediante analisi usando il sistema Operetta come descritto sopra e la generazione di miofibroblasti è stata determinata mediante analisi dell'espressione di α SMA come descritto sopra.

I risultati sono mostrati nelle Figure 26A e 26B. Si è trovato che IL-11 è necessaria per la fibrosi a valle degli stimoli pro-fibrotici vari ed è anche stata identificata come il mediatore centrale della fibrosi indotta da una varietà di fattori pro-

fibrotici differenti.

In un ulteriore esperimento, il ruolo della segnalazione di IL-11 è stato investigato nella fibrosi polmonare, utilizzando analisi di striscio *in vitro* di migrazione dei fibroblasti del polmone. In risposta agli stimoli pro-fibrotici, i fibroblasti vengono attivati e migrano all'interno della nicchia fibrotica nel corpo. Il tasso di migrazione delle cellule è una misura delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice ed è un modello per il risanamento di ferite *in vivo* (Liang et al., 2007; Nat. Protoc., 2(2):329-33).

I fibroblasti derivati dal tessuto di polmone da topi di tipo nativo (WT) ed anche knockout omozigoti IL-11RA (-/-) sono stati fatti crescere a basso passaggio su una superficie di plastica finché formavano un monostrato di cellule uniforme. È stato quindi creato uno striscio nello strato di cellule e la migrazione delle cellule vicine allo striscio è stata monitorata, o in assenza di stimolazione o in presenza di TGF β 1 o di IL-11. Immagini catturate in due istanti di tempo immediatamente dopo aver creato lo striscio a 24 ore sono state utilizzate per determinare l'area coperta dalle cellule ed il tasso di migrazione è stato confrontato fra fibroblasti WT e KO. La migrazione delle cellule (area nello striscio coperta dalle cellule dopo 24 ore) è stata normalizzata rispetto al tasso di migrazione di cellule WT senza stimolo.

I risultati sono mostrati in Figura 40. Fibroblasti di polmone derivati da topi WT sono stati mostrati migrare più velocemente in presenza di TGF β 1 e di IL-11, il che indica un effetto pro-fibrotico

di entrambe le citochine in fibroblasti di polmone. Cellule che mancano di segnalazione di IL-11 derivate da topi KO migravano più lentamente rispetto a cellule WT. Inoltre, non migravano più velocemente in presenza di TGF β 1. L'analisi di striscio rivelava che i fibroblasti di polmone che mancavano della segnalazione IL-11 hanno una diminuzione del tasso di migrazione di cellule sia in presenza di TGF β 1 o di IL-11 che alla linea basale. Pertanto, l'inibizione della segnalazione di IL-11 è anti-fibrotica nel polmone.

7.2 Fibrosi cardiaca

L'efficacia dell'inibizione di IL-11 per trattare i disturbi fibrotici è stata investigata *in vivo*. Un modello murino per la fibrosi cardiaca, in cui la fibrosi viene indotta dal trattamento con AngII, è stato utilizzato per investigare se o meno topi IL-11RA -/- fossero protetti da fibrosi cardiaca.

In breve, è stata impiantata una pompa ed i topi di tipo nativo (WT) IL-11RA (+/+) e topi knockout (KO) IL-11 RA(-/-) sono stati trattati con AngII (2 mg/kg/giorno) per 28 giorni. Al termine dell'esperimento, il contenuto di collagene è stato valutato negli atri dei topi utilizzando un kit di analisi basata su idrossiprolina colorimetrico ed il livello dell'espressione di RNA dei marcatori di fibrosi Colla2, α SMA (ACTA2) e fibronectina (Fn1) è stato analizzato mediante qPCR.

I risultati sono mostrati nelle Figure da 27A e 27D. È stato trovato che i topi IL-11 RA-/- erano protetti dagli effetti profibrotici di AngII.

7.3 Fibrosi renale

Il modello murino di fibrosi renale è stato stabilito in topo di tipo nativo (WT) IL-11 RA (+/+) e knockout (KO) IL-11 RA(-/-) mediante iniezione intraperitoneale di acido folico (180 mg/kg) in veicolo (NaHCO₃ 0,3M); ai topi di controllo è stato somministrato il solo veicolo. I reni sono stati rimossi 28 giorni post-iniezione, pesati e fissati in formalina con tampone neutro al 10% per il tricromo di Masson e colorazione Sirius oppure congelati in modo rapido per l'analisi del collagene, RNA e studi di proteine.

L'RNA totale è stato estratto da reni congelati in modo rapido utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen) ed il procedimento Qiagen TissueLyzer seguito da purificazione in colonna RNeasy (Qiagen). Il cDNA è stato preparato utilizzando il kit di sintesi di cDNA Script™, in cui ciascuna reazione conteneva 1 µg di RNA totale, secondo le istruzioni del fabbricante. L'analisi dell'espressione genica RT-PCR quantitativa è stata compiuta su campioni in triplicato o con TaqMan (Applied Biosystems) o con la tecnologia fast SYBR green (Qiagen) utilizzando StepOnePlus™ (Applied Biosystems) su 40 cicli. I dati di espressione sono stati normalizzati al livello di espressione di mRNA GAPDH ed abbiamo utilizzato il procedimento 2- $\Delta\Delta C_t$ per calcolare il numero di volte di variazione. I reni congelati in modo rapido sono stati sottoposti ad idrolisi acidi mediante riscaldamento in HCl 6M ad una concentrazione di 50 mg/ml (95°C, 20 ore). La quantità di collagene totale nell'idrolizzato è stata quantificata sulla base della rivelazione colorimetrica di

idrossiprolina utilizzando il kit di analisi di collagene totale Quickzyme (Quickzyme, Biosciences) secondo le istruzioni del fabbricante.

I risultati delle analisi sono mostrati in Figura 28. È stato mostrato che la fibrosi renale indotta da folato è dipendente dalla segnalazione mediata da IL-11. Un aumento significativo di contenuto di collagene nel tessuto renale è stato osservato in topi IL-11 RA+/+, il che è indicativo di fibrosi renale. Non è stato osservato significativo aumento del contenuto di collagene in topi IL-11 RA-/-. Animali deficiente di segnalazione di IL-11 avevano significativamente meno deposizione di collagene nei reni dopo lesione tossica rispetto ad animali di tipo nativo.

7.4 Fibrosi polmonare

IL-11 è stata confermata come mediatore chiave della fibrosi nel polmone, pelle ed occhio in ulteriori modelli *in vivo* utilizzando topi knockout IL-11 RA-/-. Gli schemi degli esperimenti sono mostrati nelle Figure da 29A a 29C.

Per analizzare la fibrosi polmonare, topi IL-11 RA-/ e topi IL-11RA+/+ sono stati trattati mediante somministrazione intra-tracheale di bleomicina al giorno 0 per stabilire una risposta fibrotica nel polmone (fibrosi polmonare). La fibrosi del polmone si sviluppa in 21 giorni, al qual punto gli animali vengono sacrificati ed analizzati per le differenze dei marcatori di fibrosi fra animali con e senza segnalazione di IL-11. Topi IL-11RA-/ avevano una ridotta risposta fibrotica nel tessuto polmonare rispetto a topi IL-11RA+/+, come è

evidente dalla ridotta espressione dei marcatori di fibrosi.

7.5 Fibrosi cutanea

Per analizzare la fibrosi cutanea, topi IL-11 RA^{-/-} e topi IL-11RA^{+/+} sono stati trattati mediante somministrazione sottocutanea di bleomicina al giorno 0 per stabilire una risposta fibrotica nella pelle. La fibrosi della pelle si sviluppa in 28 giorni, nel quale punto gli animali vengono sacrificati ed analizzati per le differenze dei marcatori di fibrosi fra animali con e senza segnalazione di IL-11. Topi IL-11RA^{-/-} avevano una ridotta risposta fibrotica nel tessuto cutaneo rispetto a topi IL-11 RA^{+/+}, come è evidenziato dalla ridotta espressione dei marcatori di fibrosi.

7.6 Fibrosi oculare

Per analizzare la fibrosi nell'occhio, topi IL-11RA^{-/-} e topi IL-11RA^{+/+} sono stati sottoposti a trabeclectomia al giorno 0 per iniziare una risposta di risanamento di ferita nell'occhio. La fibrosi dell'occhio si sviluppa in 7 giorni. La risposta fibrotica viene misurata e confrontata fra topi IL-11RA^{-/-} e topi IL-11RA^{+/+}. I topi IL-11RA^{-/-} avevano ridotta risposta fibrotica nel tessuto oculare rispetto a topi IL-11RA^{+/+}, come è evidenziato dalla ridotta espressione dei marcatori di fibrosi.

7.7 Altri tessuti

L'effetto di knockout di IL-11RA sulla fibrosi viene analizzato anche in modelli murini di fibrosi per altri tessuti, come fegato ed intestino e viene analizzato anche in un modello relativo alla fibrosi multiorgani (cioè sistemica). La risposta fibrotica viene

misurata e confrontata fra topi IL-11RA^{-/-} e topi IL-11RA^{+/+}. I topi IL-11RA^{-/-} hanno ridotta risposta fibrotica rispetto ai topi IL-11RA^{+/+}, come è evidenziato dalla ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

Esempio 8: Analisi dei meccanismi molecolari alla base dell'induzione mediata da IL-11 di fibrosi

La modalità canonica di azione di IL-11 è ritenuta essere la regolazione dell'espressione di RNA attraverso trascrizione mediata da STAT3 (Zhu et al., 2015, PLoS ONE 10, e0126296) ed anche attraverso l'attivazione di ERK.

L'attivazione di STAT3 viene osservata in seguito a stimolazione con IL-11. Tuttavia, quando i fibroblasti vengono incubati con TGF β 1, si riscontra solamente l'attivazione del percorso canonico di SMAD ed i percorsi di ERK e l'attivazione di STAT3 non è osservata, nonostante il fatto che IL-11 sia secreta in risposta a TGF β 1. Solamente l'attivazione di ERK è comune sia a TGF β 1 che alla transduzione di segnale di IL-11.

Cross-talk fra TGF β 1 e la segnalazione di IL-6 è stato descritto in precedenza, dove TGF β 1 blocca l'attivazione di STAT3 mediante IL-6 (Walia et al., 2003, FASEB J., 17, 2130-2132). Data la stretta relazione fra IL-6 ed IL-11, è possibile osservare un analogo cross-talk per la segnalazione mediata da IL-11.

Gli inventori hanno investigato mediante analisi RNA-seq se la regolazione dell'abbondanza di RNA era un meccanismo basilare per l'espressione aumentata di proteine marcatori di fibrosi in risposta

ad IL-11, il che suggerirebbe che STAT3 è il percorso di segnalazione alla base dei processi pro-fibrotici mediati da IL-11. I fibroblasti sono stati incubati per 24 ore o senza senza stimoli oppure in presenza di TGF β 1, IL-11 o TGF β 1 ed IL-11.

I risultati sono mostrati in Figura 30A. TGF β 1 induceva l'espressione di collagene, ACTA2 (α SMA) ed altri marcatori di fibrosi a livello di RNA. Tuttavia, IL-11 non regolava l'espressione di questi geni, ma un gruppo differente di geni.

Analisi di ontologia genica suggerisce che un effetto pro-fibrotico nei fibroblasti venga pilotato dall'espressione di RNA regolata da IL-11. Sia TGF β 1 che IL-11 regolano un insieme quasi completamente diverso di geni a livello dell'RNA.

Sebbene TGF β 1 aumenti la secrezione di IL-11, i geni bersaglio di IL-11 non sono regolati quando sono presenti sia TGF β 1 che IL-11. Ciò suggerisce che TGF β 1 sovra-regola IL-11 e simultaneamente blocca la regolazione pilotata da IL-11 canonica dell'espressione di RNA attraverso STAT3, analogamente a quanto è noto rispetto alla relazione dei percorsi di TGF β 1 e IL-6 (Walia et al., 2003, FASEB J., 17, 21,30-2132).

Abbiamo anche analizzato se le differenze di espressione di RNA indotte da TGF β 1 fossero dipendenti dalla segnalazione di IL-11 analizzando variazioni di espressione di RNA nei fibroblasti ottenuti da topi IL-11 RA $^{-/-}$ rispetto a topi IL-11 RA $^{+/+}$. L'espressione di RNA regolata da TGF β 1 viene ancora osservata quando cellule knockout IL-11 RA venivano stimulate con TGF β 1 ed i livelli di RNA di α SMA,

collagene, ecc., erano ancora sovra-regolati in assenza di segnalazione di IL-11 (in fibroblasti IL-11 RA-/-). Quando l'effetto pro-fibrotico di IL-11 e l'effetto anti-fibrotico dell'inibizione di IL-11 sono stati ricercati *in vitro*, si è osservata solamente ridotta espressione dei marcatori della fibrosi a livello di proteina, non a livello trascrizionale come determinato mediante qPCR.

L'attivazione dei percorsi non canonici (ad es. transduzione di segnale ERK) è noto essere cruciale per l'azione pro-fibrotica di TGF β 1 (Guo e Wang, 2008, Cell. Res., 19, 71-88). È probabile che i percorsi non canonici siano probabilmente importanti per la segnalazione per tutte le citochine pro-fibrotiche note e che IL-11 sia un regolatore post-trascrizione che è essenziale per la fibrosi.

Esempio 9: Anticorpi umani anti-IL-11 umana

Gli anticorpi anti-IL-11 umani completamente umani sono stati sviluppati tramite display di fagi.

IL-11 ricombinante umana (Cat. N. Z03108-1) ed IL-11 ricombinante murina (Cat. N. Z03052-1) sono state ottenute da GenScript (NJ, USA). IL-11 ricombinante umana è stata espressa in cellule CHO, sia come versione con Fc marcato che in versione senza marcatura. IL-11 murina senza marcatura è stata espressa in cellule HEK293.

La bioattività di IL-11 di IL-11 umana ricombinante ed IL-11 murina ricombinante è stata riconfermata mediante analisi *in vitro* utilizzando colture di cellule di fibroblasti primari.

IL-11 umana ed IL-11 murina biotinilate ricombinanti sono state

pure preparate mediante biotinilazione di molecole di IL-11 umana e IL-11 murina ricombinanti, secondo procedimenti standard.

Gli anticorpi in grado di legare sia IL-11 umana che IL-11 murina (cioè anticorpi cross-reattivi) sono stati identificati mediante display o esposizione su fagi utilizzando una libreria naive umana mediante panning usando IL-11 umana e murina ricombinanti biotinilate e non biotinilate sulla base di 16 diverse strategie di panning.

Il display fagico identificava 175 leganti scFv come "first hit". L'analisi di sequenza delle sequenze CDR da questi 175 scFv identificavano 86 scFv unici.

scFv solubili sono stati prodotti mediante espressione ricombinante in E. coli ed analizzati per la loro capacità di legarsi ad IL-11 umana ed IL-11 murina mediante ELISA. In breve, l'antigene rispettivo è stato rivestito su pozzetti di una piastra per ELISA, il surnatante di coltura cellulare contenente il rispettivo scFv è stato aggiunto ad una diluizione di 1:2 ed è stato rivelato un legame.

I risultati dell'analisi ELISA rivelavano:

- 8 scFv in grado di legarsi solamente ad IL-11 umana;
- 6 scFv in grado di legarsi a IL-11 murina soltanto;
- 32 scFv che presentano solamente debole legame a IL-11 umana/murina, con un rapporto di segnale/rumore elevato; e
- 40 scFv che hanno reattività incrociata sia per IL-11 umana che per IL-11 murina.

Da questi 86 scFv, sono stati scelti 56 candidati per ulteriore

caratterizzazione funzionale. Per ulteriore analisi, gli scFv sono stati clonati in formato scFv-Fc in E. coli.

Le sequenze VH e VL degli anticorpi sono state clonate in vettori di espressione per la generazione di anticorpi scFv-Fc (IgG1 umana). I vettori sono stati espressi in modo transitorio in cellule di mammifero coltivate in terreni privi di siero ed isolati mediante purificazione a proteina A.

Esempio 10: Caratterizzazione funzionale di anticorpi umani anti-IL-11 umana

Gli anticorpi descritti nell'Esempio 9 sono stati analizzati in analisi *in vitro* per la loro capacità di (i) inibire la segnalazione mediata da IL-11 umana, e (ii) inibire la segnalazione mediata da IL-11 murina. L'affinità degli anticorpi per IL-11 umana è stata anche analizzata mediante ELISA.

10.1 Capacità di inibire la segnalazione mediata da IL-11 umana

Per investigare la capacità di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11 umana, fibroblasti di atrio cardiaco sono stati coltivati in pozzetti di piastre da 96 pozzetti in presenza di TGF β 1 (5 ng/ml) per 24 ore, in presenza o in assenza di anticorpi anti-IL-11. TGF β 1 promuove l'espressione di IL-11, che a sua volta guida la transizione di fibroblasti quiescenti a fibroblasti attivati positivi ad α SMA. È stato mostrato in precedenza che la neutralizzazione di IL-11 impedisce la transizione indotta da TGF β 1 a fibroblasti positivi per α SMA attivati.

L'espressione di α SMA è stata analizzata con il Sistema di

acquisizione di immagini ad elevato contenuto Operetta in un modo automatizzato ad alta resa.

In colture non stimolate, -29,7% (=1) dei fibroblasti erano fibroblasti attivati positivi ad aSMA al termine del periodo di coltura di 24 ore, mentre -52% (=1,81) dei fibroblasti erano positivi ad aSMA in colture che erano state stimolate con TGF β 1 in assenza di anticorpi anti-IL-11.

Anticorpi anti-IL-11 (2 μ g/ml) sono stati aggiunti a colture di fibroblasti che erano state stimolate con TGF β 1 ed al termine del periodo di coltura di 24 ore, è stata determinata la percentuale di fibroblasti positivi ad aSMA. Le percentuali sono state normalizzate sulla base della percentuale di fibroblasti positivi ad aSMA osservati in colture di fibroblasti che non erano state stimolate con TGF β 1.

28 degli anticorpi sono stati dimostrati essere in grado di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11 umana.

Un anticorpo anti-IL-11 murino monoclonale commerciale (IgG_{2A} murina monoclonale; clone #22626; Catalogo N. MAB218; R&D Systems, MN, USA) è stato anche analizzato per la capacità di inibire la segnalazione mediante IL-11 umana negli esperimenti. Si è trovato che questo anticorpo era in grado di ridurre la percentuale di fibroblasti attivati al 28,3% (=0,99).

Diversi dei cloni neutralizzavano la segnalazione da parte di IL-11 umana in misura maggiore rispetto all'anticorpo anti-IL-11 murino disponibile in commercio (standard dell'industria).

10.2 Capacità di inibire la segnalazione mediata da IL-11 murina

La capacità di anticorpi umani di inibire la segnalazione mediata da IL-11 murina è stata pure investigata, seguendo la stessa procedura descritta nella precedente sezione 10.1 sopra, ma utilizzando fibroblasti di derma murino invece di fibroblasti atriali umani.

Dopo 24 ore in coltura, circa 31,8% (=1) di cellule non stimolate in coltura erano fibroblasti attivati. La stimolazione con TGF β 1 dava come risultato un aumento di ~2 volte nella percentuale dei fibroblasti attivati (68,8%, =2,16) rispetto a colture non stimolate.

È stato dimostrato che gli anticorpi erano in grado di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11 murina. L'anticorpo anti-IL-11 IgG2A murina monoclonale, clone #22626, Catalogo N. MAB218, è stato pure analizzato per la capacità di inibire la segnalazione tramite IL-11 murina. Si è trovato che questo anticorpo era in grado di ridurre la percentuale di fibroblasti attivati al 39,4% (=1,24).

Diversi dei cloni neutralizzavano la segnalazione mediante IL-11 murina in misura maggiore dell'anticorpo anti-IL-11 murino disponibile in commercio (standard dell'industria).

10.3 Analisi di affinità di anticorpo per IL-11 umana

Gli anticorpi umani anti-IL-11 umana sono stati analizzati per la loro affinità di legame ad IL-11 umana mediante analisi ELISA.

IL-11 umana ricombinante è stata ottenuta da Genscript e anticorpo anti-IgG umana (Fc-specifico) coniugato con perossidasi di

rafano (HRP) è stato ottenuto da Sigma. Piastre per ELISA da 96 pozzetti Corning sono state ottenute da Sigma. Il kit di substrato per ELISA 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) di Pierce è stato ottenuto da Life Technologies (soluzione da 0,4 g/mL di TMB, perossido di idrogeno allo 0,02% in tampone di acido citrico). Albumina sierica bovina ed acido solforico sono stati ottenuti da Sigma. Il tampone di lavaggio comprendeva lo 0,05% di Tween-20 in salina tamponata con fosfato (PBS-T). Gli anticorpi scFv-Fc sono stati generati come descritti sopra. Controlli di IgG murina ed umana purificati sono stati acquistati da Life Technologies. Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant è stato utilizzato per misurare l'assorbanza.

Analisi di diluizione seriale criss-cross è stata condotta come descritto da Hornbeck et al. (2015), *Curr. Protoc. Immunol.*, 110, 2.1.1-23 per determinare la concentrazione ottimale dell'antigene di rivestimento, anticorpi primari e secondari.

È stata eseguita analisi ELISA indiretta per valutare l'affinità di legame di anticorpi scFv-Fc primari al 50% di concentrazione effettiva (EC_{50}) come descritto precedentemente (Unverdorben et al. (2016), *MAbs* 8, 120-128). Piastre per ELISA sono state rivestite con 1 μ g/mL di IL-11 umana ricombinante durante la notte a 4°C ed i rimanenti siti di legame sono stati bloccati con il 2% di BSA in PBS. Gli anticorpi ScFv-Fc sono stati diluiti in 1% di BSA in PBS, titolati per ottenere concentrazioni di lavoro di 800, 200, 50, 12,5, 3,125, 0,78, 0,195 e 0,049 ng/mL ed incubati in duplicato per 2 ore a temperatura ambiente. La rivelazione di legamenti antigene-anticorpo

è stata condotta con 15,625 ng/mL di anticorpo anti-IgG umana (Fc-specifico) coniugato con HRP. Dopo 2 ore di incubazione con l'anticorpo di rivelazione, 100 µL di substrato di TMB sono stati aggiunti per 15 min e la reazione cromogenica è stata arrestata con 100 µl di H₂SO₄ 2M.

La lettura di assorbanza è stata misurata a 450 nm con correzione di lunghezza d'onda di riferimento a 570 nm. I dati sono stati interpolati con il software GraphPad Prism con trasformazione logaritmica delle concentrazioni di anticorpo seguita da analisi di regressione non lineare con una curva dose-risposta logistica asimmetrica (a cinque parametri) per determinare i valori di EC50 individuali.

Gli stessi materiali e procedure descritti sopra sono stati usati per determinare l'affinità di legame per anticorpi monoclonali murini anti-IL-11 con l'eccezione che sia utilizzato anticorpo anti-IgG murina coniugato a HRP (H&L) al posto dell'anticorpo anti-IgG umana coniugato a HRP.

Gli stessi materiali e procedure descritti sopra sono stati usati per determinare l'affinità di legame per anticorpi anti-IL-11 monoclonali umani ed anticorpi anti-IL-11 monoclonali murini a IL-11 murino ricombinante ottenuto da Genscript.

I risultati dell'analisi ELISA sono stati utilizzati per determinare i valori IC50 per gli anticorpi.

10.4 Capacità di inibire la segnalazione mediata da IL-11 in una varietà di tessuti

La capacità degli anticorpi di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11 in fibroblasti ottenuti da una varietà di diversi tessuti, è stata investigata, essenzialmente come descritto nella sezione 10.1 eccetto che invece di fibroblasti umani atriali cardiaci, sono stati utilizzati per gli esperimenti fibroblasti umani derivati da fegato, polmone, rene, occhio, pelle, pancreas, milza, intestino, cervello e midollo osseo.

Gli anticorpi anti-IL-11 si sono dimostrati in grado di neutralizzare la segnalazione dei fibroblasti derivati da vari tessuti differenti, come determinato da osservazione della diminuzione relativa nella proporzione di fibroblasti positiva ad α SMA al termine del periodo di coltura di 24 ore in presenza di anticorpi anti-IL-11 rispetto ad una coltura in assenza degli anticorpi.

Esempio 11: Inibizione della fibrosi in vivo utilizzando anticorpi anti-IL-11

L'attività terapeutica di anticorpi anti-IL-11 umana è stata dimostrata in modelli murini *in vivo* di fibrosi per vari tessuti differenti.

11.1 Fibrosi cardiaca

Una pompa viene impiantata ed i topi vengono trattati con AngII (2 mg/kg/giorno) per 28 giorni.

Anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione o anticorpi di controllo vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa. Al termine dell'esperimento, il contenuto di

collagene viene valutato negli atri dei topi utilizzando un kit di analisi a base di idrossiprolina calorimetrica ed il livello di espressione di RNA di marcatori di fibrosi CollA2, α SMA (ACTA2) e fibronectina (Fn1) sono stati analizzati mediante qPCR.

I topi trattati con anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto cardiaco rispetto ai topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

11.2 Fibrosi renale

Un modello murino di fibrosi renale viene stabilito, in cui la fibrosi viene indotta mediante iniezione intraperitoneale di acido folico (180 mg/kg) in veicolo (NaHCO₃ 0,3M); ai topi di controllo è stato somministrato il solo veicolo.

Anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione o anticorpi di controllo vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa. I reni vengono rimossi al giorno 28, pesati e o fissati in 10% di formalina tamponata con tampone neutro per tricroma di Masson e colorazione Sirius oppure congelato in modo rapido per l'analisi di collagene, RNA e studi di proteine.

L'RNA totale viene estratto da rene congelato in modo rapido utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen) e procedimento Qiagen TissueLyzer seguito da purificazione in colonna RNeasy (Qiagen). Il cDNA viene preparato utilizzando un kit di sintesi Script™ cDNA, in cui ciascuna reazione conteneva 1 µg di RNA totale, secondo le istruzioni del fabbricante. L'analisi di espressione di geni mediante

RT-PCR quantitativa è stata eseguita su campioni in triplicato o con TaqMan (Applied Biosystems) o con tecnologia fast SYBR green (Qiagen) utilizzando StepOnePlus™ (Applied Biosystem) su 40 cicli. I dati di espressione vengono normalizzati per il livello di espressione di mRNA GAPDH ed il procedimento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ è stato utilizzato per calcolare il numero di volte di variazione. Reni congelati in modo rapido sono stati sottoposti ad idrolisi acida mediante riscaldamento in HCl 6M ad una concentrazione di 50 mg/ml (95°C, 20 ore). La quantità di collagene totale nell'idrolizzato viene quantificata sulla base della rivelazione colorimetrica di idrossiprolina utilizzando un kit di analisi di collagene totale Quickzyme (Quickzyme Biosciences) secondo le istruzioni del fabbricante.

Topi trattati con anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto renale rispetto a topi trattati con gli anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

11.3 Fibrosi polmonare

I topi vengono trattati mediante somministrazione intratecale di bleomicina al giorno 0 per stabilire una risposta fibrotica nel polmone (fibrosi polmonare).

Anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione, o anticorpi di controllo, vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa. I topi vengono sacrificati al giorno 21 ed analizzati per differenze in marcatori di fibrosi.

I topi trattati con anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto polmonare rispetto ai topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

11.4 Fibrosi cutanea

I topi vengono trattati mediante somministrazione sottocutanea di bleomicina al giorno 0 per stabilire una risposta fibrotica nella pelle.

Gli anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione, o anticorpi di controllo, vengono somministrati a diversi gruppi di topi mediante iniezione endovenosa. I topi vengono sacrificati al giorno 21 ed analizzati per differenze in marcatori di fibrosi.

I topi trattati con anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto cutaneo rispetto a topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione di marcatori di fibrosi.

11.5 Fibrosi dell'occhio

I topi hanno subito trabeculectomia al giorno 0 per iniziare una risposta di risanamento di ferita nell'occhio.

Gli anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione, o anticorpi di controllo, vengono somministrati a gruppi differenti di topi mediante iniezione endovenosa e la fibrosi viene monitorata nel tessuto oculare.

I topi trattati con gli anticorpi-IL-11 di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto oculare rispetto a topi

trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione di marcatori di fibrosi.

11.6 Altri tessuti

L'effetto del trattamento con anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione sulla fibrosi viene anche analizzato in modelli murini di fibrosi per altri tessuti, come fegato, rene, intestino e viene anche analizzato in un modello relativo a fibrosi su organi multipli (cioè sistemica).

I topi trattati con gli anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica rispetto a topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione di marcatori di fibrosi.

Esempio 12: Anticorpi anti-IL-11R α umano

Gli anticorpi monoclonali murini diretti contro la proteina IL-11R α umana sono stati generati nel modo seguente.

Il cDNA che codifica l'amminoacido per IL-11R α umano è stato clonato in plasmidi di espressione (Aldevron GmbH, Friburgo, Germania).

I topi sono stati immunizzati mediante applicazione transdermica di particelle d'oro rivestite di DNA utilizzando un dispositivo portatile per il bombardamento di particelle ("pistola genica"). I campioni di siero sono stati raccolti dai topi dopo una serie di immunizzazioni e sono stati testati in flussocitometria su cellule HEK che erano state trasfettate in modo transitorio con i plasmidi di espressione di IL-11R α umano (espressione di superficie cellulare di

IL-11R α umano mediante cellule HEK transfettate in modo transitorio è stato confermato mediante gli anticorpi anti-tag che riconoscono una marcatura aggiunta all'N-terminale della proteina IL-11R α).

Cellule di produzione di anticorpi sono state isolate dai topi e fuse con cellule di mieloma di topo (Ag8) in conformità con le procedure standard.

Ibridomi che producono anticorpi specifici per IL-11R α sono stati identificati mediante screening per la capacità di legarsi a cellule HEK che esprimono IL-11R α mediante flussocitometria.

Pellet di cellule di cellule di ibridoma positive sono state preparate utilizzando un agente di protezione di RNA (RNAlater, cat. #AM7020 di ThermoFisher Scientific) ed ulteriormente trattate per sequenziamento dei domini variabili degli anticorpi.

Il sequenziamento è stato condotto utilizzando il kit di sequenziamento di ciclo BigDye $\text{\textcircled{R}}$ Terminator v3.1 (Life Technologies $\text{\textcircled{R}}$) secondo le istruzioni del fabbricante. Tutti i dati sono stati raccolti utilizzando un sistema analizzatore di DNA 3730xl ed il software di raccolta dati unificati (Life Technologies $\text{\textcircled{R}}$). L'assemblaggio delle sequenze è stato condotto utilizzando un CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Chiamate di base miste sono state risolte assegnando automaticamente la chiamata di base più prevalente alle chiamate di base miste. La prevalenza è stata determinata sia per frequenza di una chiamata di base che per qualità individuale delle chiamate di base.

In totale, sono stati generati 17 cloni di anticorpo anti-IL-

IL1R α umano monoclonale murino.

Esempio 13: Caratterizzazione funzionale di anticorpi anti-IL-11R α umano

13.1. Capacità di inibire la segnalazione mediata da IL-11/IL-11R umano

Per investigare la capacità di anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11/IL-11R umano, fibroblasti umani atriali cardiaci sono stati coltivati in pozzetti di piastre da 96 pozzetti in presenza di TGF β 1 (5 ng/ml) per 24 ore, in presenza o in assenza di anticorpi anti-IL-11R α . Questo stimolo pro-fibrotico promuove l'espressione di IL-11, che a sua volta spinge la transizione di fibroblasti quiescenti a fibroblasti attivati positivi ad α SMA. È stato mostrato in precedenza che la neutralizzazione di IL-11 impedisce la transizione indotta da TGF β 1 a fibroblasti attivati positiva ad α SMA.

Anticorpi anti-IL-11R α (2 μ g/ml) sono stati aggiunti a colture di fibroblasti che sono state stimulate con TGF β 1 ed al termine del periodo di coltura di 24 ore, la percentuale di fibroblasti positivi ad α SMA sono stati determinati. Le percentuali sono state normalizzate sulla base della percentuale di fibroblasti positivi ad α SMA osservati in colture di fibroblasti che erano stati stimolati con TGF β 1.

L'espressione di α SMA è stata analizzata con il sistema di acquisizione di immagini ad alto contenuto Operetta in modo automatizzato ad alta resa.

La stimolazione con TGF β 1 ha dato come risultato un aumento di 1,58 volte del numero di fibroblasti attivati positivi a aSMA al termine del periodo di coltura di 24 ore in assenza di anticorpi anti-IL-11R α .

Un anticorpo anti-IL-11 murino monoclonale commerciale (IgG_{2A} monoclonale murina; clone #22626; Catalogo N. MAB218; R&D Systems, MN, USA) è stato incluso come controllo. Questo anticorpo si è trovato che era in grado di ridurre la percentuale di fibroblasti attivati a 0,89 volte la percentuale di fibroblasti attivati in colture non stimolate (cioè in assenza di stimolo con TGF β 1).

Si è trovato che gli anticorpi anti-IL-11R α erano in grado di inibire la segnalazione di IL-11/IL-11R in fibroblasti umani e diversi erano in grado di inibire la segnalazione di IL-11/IL-11R in misura maggiore rispetto all'anticorpo anti-IL-11 murino monoclonale.

13.2 Capacità di inibire la segnalazione mediata da IL-11 murina

La capacità degli anticorpi anti-IL-11R α di inibire la segnalazione mediata da IL-11 murina è stata pure investigata seguendo la medesima procedura descritta nella sezione 13.1 precedente, ma utilizzando fibroblasti atriali murini invece di fibroblasti atriali umani.

La stimolazione con TGF β 1 ha dato come risultato un aumento di 2,24 volte nel numero di fibroblasti attivati positivi ad aSMA al termine del periodo di coltura di 24 ore in assenza di anticorpi anti-IL-11R α .

L'anticorpo anti-IL-11 murino monoclonale commerciale (IgG_{2A}

monoclonale murina; clone #22626; Catalogo N. MAB218, R&D Systems, MN, USA) è stato incluso come controllo. È stato trovato che questo anticorpo era in grado di ridurre la percentuale di fibroblasti attivati a 1,44 volte rispetto alla percentuale di fibroblasti attivati in colture non stimolate (cioè in assenza di stimolo con TGF β 1).

Gli anticorpi anti-IL-11R α sono stati trovati in grado di inibire la segnalazione di IL-11/IL-11R in fibroblasti murini e diversi erano in grado di inibire la segnalazione di IL-11/IL-11R in misura maggiore rispetto all'anticorpo anti-IL-11 murino monoclonale.

13.3 Screening per la capacità di legare IL-11R α

Ibridomi murini che producono anticorpi anti-IL-11R α umani sono stati sotto-clonati ed il surnatante di coltura cellulare dagli ibridomi subclonati è stato analizzato mediante analisi "mix-and-measure" iQue per (i) per la capacità di legarsi a IL-11R α umano, e (ii) reattività incrociata ad antigeni diversi da IL-11R α .

In breve, cellule di controllo marcate (che non esprimono IL-11R α in corrispondenza della superficie cellulare) e cellule bersaglio non marcate che esprimono IL-11R α umano alla loro superficie (a seguito di transfezione transitoria con un plasmide che codifica un IL-11 Ra umano con marcato con FLAG) sono state miscelate insieme con il surnatante di coltura cellulare (contenente anticorpi anti-IL-11R α murini) ed anticorpi di rivelazione secondari (anticorpo anti-IgG murino marcato in modo fluorescente).

Le cellule sono state quindi analizzate mediante il sistema di

screening HTFC (iQue) per due marcatori (cioè il marcatore cellulare ed il marcatore sull'anticorpo secondario). La rivelazione dell'anticorpo secondario su cellule che esprimono IL-11R α non marcato indicava la capacità di anticorpi anti-IL-11R α murini di legarsi a IL-11R α . La rivelazione dell'anticorpo secondario sulle cellule di controllo marcate, indicava reattività incrociata degli anticorpi anti-IL-11R α murini per bersagli diversi da IL-11R α .

Come condizione di controllo positivo, cellule marcate e non marcate sono state incubate con un anticorpo anti-tag FLAG murino come anticorpo primario.

La maggior parte degli ibridomi subclonati esprimeva l'anticorpo che è in grado di legarsi a IL-11R α umano e che riconosceva questo bersaglio con alta specificità.

13.4 Analisi di affinità di anticorpo per IL-11R α umano

Anticorpi anti-IL-11R α umano sono stati analizzati per la loro affinità di legame ad IL-11R α umano mediante analisi ELISA.

IL-11R α umano ricombinante è stato ottenuto da Genscript e anticorpo anti-IgG umano (Fc-specifico) coniugato con perossidasi di rafano (HRP) è stato ottenuto da Sigma. Piastre Corning per ELISA da 96 pozzetti sono state ottenute da Sigma. Un kit di substrato per ELISA 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) di Pierce è stato ottenuto da Life Technologies (0,4 g/mL di soluzione TMB, 0,02% perossido di idrogeno in tampone acido citrico). Albumina sierica bovina ed acido solforico sono ottenuti da Sigma. Il tampone di lavaggio comprende lo 0,05% di Tween-20 in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS-T).

IgG di controllo purificate sono state acquistate da Life Technologies. Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant viene utilizzato per misurare l'assorbanza.

L'analisi di diluizione seriale criss-cross è stata condotta come descritto in Hornbeck et al. (2015), *Curr. Protoc. Immunol.*, 110, 2.1.1-23) per determinare la concentrazione ottimale di antigene di rivestimento, anticorpi primario e secondario.

Una ELISA indiretta è stata condotta per valutare l'affinità di legame di anticorpi anti-IL-11R α murini ad una concentrazione efficace del 50% (EC₅₀) come descritto in precedenza (Unverdorben et al. (2016), *MABs* 8, 120-128). Piastre per ELISA sono state rivestite con 1 μ g/mL di IL-11R α ricombinante umano durante la notte a 4°C ed i restanti siti di legame sono stati bloccati con il 2% di BSA in PBS. Gli anticorpi sono diluiti in 1% di BSA in PBS, titolati per ottenere concentrazioni di lavoro di 800, 200, 50, 12,5, 3,125, 0,78, 0,195 e 0,049 ng/mL ed incubati in duplicato per 2 ore a temperatura ambiente. La rivelazione del legame antigene-anticorpo è stata condotta con 15,625 ng/mL di anticorpo anti-IgG murina coniugato con HRP. Dopo 2 ore di incubazione con l'anticorpo di rivelazione. 100 μ l di substrato di TMB vengono aggiunti per 15 min e la reazione cromogenica viene arrestata con 100 μ l di H₂SO₄ 2M. La lettura di assorbanza viene misurata a 450 nm con correzione di lunghezza d'onda di riferimento a 570 nm. I dati vengono interpolati con il software GraphPad Prism con trasformazione logaritmica delle concentrazioni di anticorpo seguita da analisi di regressione non lineare con una curva

dose/risposta logistica asimmetrica (a cinque parametri) per determinare i valori di EC individuali.

13.5 Capacità di inibire la segnalazione di IL-11/IL-11R umano in una varietà di tessuti

La capacità degli anticorpi di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11R α in fibroblasti ottenuti da una varietà di diversi tessuti, è stata investigata, essenzialmente come descritto nella sezione 13.1 eccetto che invece di fibroblasti umani atriali cardiaci, sono stati utilizzati per gli esperimenti fibroblasti umani derivati da fegato, polmone, rene, occhio, pelle, pancreas, milza, intestino, cervello e midollo osseo.

Gli anticorpi anti-IL-11R α si sono dimostrati in grado di neutralizzare la segnalazione di IL-11/IL-11R in fibroblasti derivati da vari tessuti differenti, come determinato da osservazione della diminuzione relativa nella proporzione di fibroblasti positiva ad α SMA al termine del periodo di coltura di 24 ore in presenza di anticorpi anti-IL-11R α rispetto ad una coltura in assenza degli anticorpi.

Esempio 14: Inibizione della fibrosi in vivo utilizzando anticorpi anti-IL-11R α

L'attività terapeutica di anticorpi anti-IL-11R α umani è stata dimostrata in modelli murini *in vivo* di fibrosi per vari tessuti differenti.

14.1 Fibrosi cardiaca

Una pompa viene impiantata ed i topi vengono trattati con AngII

(2 mg/kg/giorno) per 28 giorni.

Anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione o anticorpi di controllo vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa. Al termine dell'esperimento, il contenuto di collagene viene valutato negli atri dei topi utilizzando un kit di analisi a base di idrossiprolina calorimetrica ed il livello di espressione di RNA di marcatori di fibrosi CollA2, α SMA (ACTA2) e fibronectina (Fn1) sono stati analizzati mediante qPCR.

I topi trattati con anticorpi anti-IL-11 di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto cardiaco rispetto ai topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

14.2 Fibrosi renale

Un modello murino di fibrosi renale viene stabilito, in cui la fibrosi viene indotta mediante iniezione intraperitoneale di acido folico (180 mg/kg) in veicolo (NaHCO₃ 0,3M); ai topi di controllo è stato somministrato il solo veicolo.

Anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione o anticorpi di controllo vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa. I reni vengono rimossi al giorno 28, pesati e o fissati in 10% di formalina tamponata con tampone neutro per tricroma di Masson e colorazione Sirius oppure congelato in modo rapido per l'analisi di collagene, RNA e studi di proteine.

L'RNA totale viene estratto da rene congelato in modo rapido utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen) e procedimento Qiagen

TissueLyzer seguito da purificazione in colonna RNeasy (Qiagen). Il cDNA viene preparato utilizzando un kit di sintesi Script™ cDNA, in cui ciascuna reazione conteneva 1 µg di RNA totale, secondo le istruzioni del fabbricante. L'analisi di espressione di geni mediante RT-PCR quantitativa è stata eseguita su campioni in triplicato o con TaqMan (Applied Biosystems) o con tecnologia fast SYBR green (Qiagen) utilizzando StepOnePlus™ (Applied Biosystem) su 40 cicli. I dati di espressione vengono normalizzati per il livello di espressione di mRNA GAPDH ed il procedimento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ è stato utilizzato per calcolare il numero di volte di variazione. Reni congelati in modo rapido sono stati sottoposti ad idrolisi acida mediante riscaldamento in HCl 6M ad una concentrazione di 50 mg/ml (95°C, 20 ore). La quantità di collagene totale nell'idrolizzato viene quantificata sulla base della rivelazione colorimetrica di idrossi-prolina utilizzando un kit di analisi di collagene totale Quickzyme (Quickzyme Biosciences) secondo le istruzioni del fabbricante.

Topi trattati con anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto renale rispetto a topi trattati con gli anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

14.3 Fibrosi polmonare

I topi vengono trattati mediante somministrazione intratecale di bleomicina al giorno 0 per stabilire una risposta fibrotica nel polmone (fibrosi polmonare).

Anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione, o anticorpi di

controllo, vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa. I topi vengono sacrificati al giorno 21 ed analizzati per differenze in marcatori di fibrosi.

I topi trattati con anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto polmonare rispetto ai topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

14.4 Fibrosi cutanea

I topi vengono trattati mediante somministrazione sottocutanea di bleomicina al giorno 0 per stabilire una risposta fibrotica nella pelle.

Gli anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione, o anticorpi di controllo, vengono somministrati a diversi gruppi di topi mediante iniezione endovenosa. I topi vengono sacrificati al giorno 21 ed analizzati per differenze in marcatori di fibrosi.

I topi trattati con anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto cutaneo rispetto a topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione di marcatori di fibrosi.

14.5 Fibrosi dell'occhio

I topi hanno subito trabeclectomia al giorno 0 per iniziare una risposta di risanamento di ferita nell'occhio.

Gli anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione, o anticorpi di controllo, vengono somministrati a gruppi differenti di topi mediante iniezione endovenosa e la fibrosi viene monitorata nel tessuto

oculare.

I topi trattati con gli anticorpi-IL-11R α di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto oculare rispetto a topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione di marcatori di fibrosi.

14.6 Altri tessuti

L'effetto del trattamento con anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione sulla fibrosi viene anche analizzato in modelli murini di fibrosi per altri tessuti, come fegato, rene, intestino e viene anche analizzato in un modello relativo a fibrosi su organi multipli (cioè sistemica).

I topi trattati con gli anticorpi anti-IL-11R α di neutralizzazione hanno ridotta risposta fibrotica rispetto a topi trattati con anticorpi di controllo, come è evidenziato da ridotta espressione di marcatori di fibrosi.

Esempio 15: Recettori decoy di IL-11R α

15.1 Costrutti del recettore decoy di IL-11

Molecole del recettore decoy di IL-11 sono state progettate e clonate nel vettore pTT5 per l'espressione ricombinante in cellule 293-6E.

In breve, un inserto per il plasmide comprendente cDNA che codifica i domini D1, D2 e D3 di legame di ligando di gp130 in quadro con cDNA che codifica o una regione linker da 50 amminoacidi o una regione linker da 33 amminoacidi, seguito da cDNA che codifica i domini D2 e D3 di legame di ligando di IL-11R α umano, seguito da cDNA

che codifica il tag FLAG. L'inserito di cDNA incorporava una sequenza leader, sequenze di Kozak all'estremità 5' ed includeva un sito di restrizione EcoRI in 5' ed un sito di restrizione HindIII in 3' (a valle di un codone di stop) per l'inserzione nel vettore pTT5.

I due costrutti che codificano una molecola di recettore decoy di IL-11 avente una sequenza o di 50 amminoacidi o di 33 amminoacidi sono rispettivamente indicati come recettore decoy di IL-11 1 (D11R1) e recettore decoy di IL-11 2 (D11R2).

15.2 Espressione e purificazione del recettore decoy di IL-11

I costrutti sono stati transfettati in cellule 293-6E per l'espressione ricombinante e la purificazione.

Cellule 293-6E sono state fatte crescere in terreno di espressione privo di siero FreeStyle™ 293 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Le cellule sono state mantenute in beute Erlenmeyer (Corning Inc., Acton, MA) a 37°C con CO₂ al 5% su un agitatore orbitale (VWR Scientific, Chester, PA).

Un giorno prima della transfezione, le cellule sono state seminate ad una densità appropriata in beute Erlenmeyer Corning. Al giorno della transfezione, il DNA ed il reagente di transfezione sono stati miscelati ad un rapporto ottimale e quindi aggiunti nella beuta con cellule pronte per la transfezione. I plasmidi ricombinanti che codificano D11R1 e D11R2 sono stati transfettati in modo transitorio in colture di cellule 293-6E in sospensione in due giorni separati.

I surnatanti di coltura cellulare sono stati raccolti al giorno 6 ed utilizzati per la purificazione. In breve, brodi di coltura

cellulare sono stati centrifugati e filtrati. 0,5 ml di resina sono stati aggiunti al surnatante di coltura cellulare ed incubati per 3-4 ore per catturare la proteina bersaglio.

Dopo il lavaggio ed eluizione con i tamponi appropriati, le frazioni eluite sono state analizzate mediante SDS-PAGE ed Western blot utilizzando Ab policlonale anti-FLAG di coniglio (GeneScript, Cat. N. A00170) per confermare l'espressione di molecole del recettore decoy per IL-11 marcate con FLAG.

Le specie purificate sono state quantificate e conservate a -80°C .

Esempio 16: Caratterizzazione funzionale del recettore decoy di IL-11

16.1 Capacità di inibire la segnalazione di mediata da IL-11 umana

Per investigare la capacità di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11 umana, sono stati coltivati fibroblasti umani atriali cardiaci in pozzetti di piastre da 96 pozzetti in presenza di TGF β 1 (5 ng/ml) per 24 ore, in presenza o in assenza di varie concentrazioni di D11R1 o D11R2.

TGF β 1 promuove l'espressione di IL-11, che a sua volta guida la transizione di fibroblasti quiescenti a fibroblasti attivati positivi ad α SMA. Si è dimostrato in precedenza che la neutralizzazione di IL-11 impedisce la transizione indotta da TGF β 1 di fibroblasti positivi ad α SMA attivati.

L'espressione di α SMA è stata analizzata con il sistema Operetta di acquisizione di immagini ad alto contenuto in modo automatizzato ad alta resa.

D11R1 o D11R2 sono stati aggiunti a colture di fibroblasti che erano stimolati con TGF β 1 a concentrazioni finali di 5 ng/ml, 50 ng/ml e 500 ng/ml e al termine del periodo di coltura di 24 ore, è stata determinata la percentuale di fibroblasti positivi ad α SMA in coltura.

È stato dimostrato che entrambi D11R1 e D11R2 erano in grado di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11 umana in modo dipendente dalla dose.

I risultati degli esperimenti sono mostrati nelle Figure 32A e 32B. È stato dimostrato che sia D11R1 che D11R2 sono in grado di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11 umana in modo dipendente dalla dose.

La IC₅₀ per le molecole D11R1 e D11R2 è stata determinata pari a ~1 nM.

16.2 Capacità di inibire la segnalazione mediata da IL-11 murina

La capacità di D11R1 e D11R2 di inibire la segnalazione mediata da IL-11 murina viene investigata seguendo la stessa procedura descritta nella precedente sezione 16.1, ma utilizzando fibroblasti dermici di topo invece di fibroblasti atriali umani.

D11R1 e D11R2 sono stati dimostrati in grado di neutralizzare la segnalazione di IL-11/IL-11R in fibroblasti di derma di topo, come determinato mediante osservazione di una diminuzione relativa di proporzione di fibroblasti positivi ad α SMA al termine del periodo di coltura di 24 ore in presenza di D11R1 o D11R2 rispetto alla coltura in assenza di recettori decoy di IL-11.

16.3 Analisi dell'affinità del recettore decoy di IL-11 per IL-11

D11R1 e D11R2 sono stati analizzati per la loro affinità di legame a IL-11 umana mediante analisi ELISA.

IL-11 umana ricombinante è stata ottenuta da Genscript ed è ottenuto l'anticorpo anti-FLAG coniugato con perossidasi di rafano (HRP). Piastre per ELISA da 96 pozzetti Corning sono state ottenute da Sigma. Il kit di substrato per ELISA 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Pierce è stato ottenuto da Life Technologies (0,4 g/mL di soluzione TMB, 0,02% di perossido di idrogeno in tampone di acido citrico). Albumina sierica bovina ed acido solforico sono stati ottenuti dalla Sigma. Il tampone di lavaggio comprendeva lo 0,05% di Tween-20 in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS-T). Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant è stato utilizzato per misurare l'assorbanza.

ELISA indiretta è stata condotta per valutare l'affinità di legame di D11R1 e D11R2 al 50% di concentrazione efficace (ED_{50}) come descritto in precedenza (Unverdorben et al. (2016), MAbs 8, 120-128). Piastre per ELISA sono state rivestite con 1 μ g/mL di IL-11 umana ricombinante durante la notte a 4°C ed i restanti siti di legame sono stati bloccati con 2% di BSA in PBS. D11R1 e D11R2 sono stati diluiti in 1% di BSA in PBS, titolati per ottenere concentrazioni di lavoro di 800, 200, 50, 12,5, 3,125, 0,78, 0,195 e 0,049 ng/mL ed incubati in duplicato per 2 ore a temperatura ambiente. La rivelazione del recettore decoy di antigene di IL-11 viene condotta con anticorpo anti-FLAG coniugato con HRP. Dopo 2 ore di incubazione con

l'anticorpo di rivelazione, 100 µl di substrato TMB vengono aggiunti per 15 min e la reazione cromogenica viene arrestata con 100 µl di H₂SO₄ 2M. La lettura di assorbanza viene misurata a 450 nm con correzione di lunghezza d'onda di riferimento a 570 nm. I dati vengono interpolati con il software GraphPad Prism con trasformazione logaritmica delle concentrazioni del recettore decoy di IL-11 seguito da analisi di regressione non lineare con una curva dose-risposta logistica asimmetrica (a cinque parametri) per determinare i valori di EC50.

Gli stessi materiali e procedure descritti sopra sono stati eseguiti per determinare l'affinità di legame a IL-11 murina ricombinante ottenuta da Genscript.

16.4 Capacità di inibire la segnalazione mediata da IL-11 umana in una varietà di tessuti

La capacità dei recettori decoy di IL-11 D11R1 e D11R2 di neutralizzare la segnalazione mediata da IL-11 in fibroblasti ottenuti da una varietà di diversi tessuti è stata investigata, essenzialmente come descritto nella sezione 18.1 eccetto che invece di fibroblasti umani atriali cardiaci sono stati utilizzati per gli esperimenti fibroblasti umani derivati da fegato, polmone, rene, occhio, pelle, pancreas, milza, intestino, cervello e midollo osseo.

Si è dimostrato che D11R1 e D11R2 sono in grado di neutralizzare la segnalazione in fibroblasti derivati da vari tessuti diversi, come determinato mediante l'osservazione di una diminuzione relativa della proporzione di fibroblasti positivi ad aSMA al termine del periodo di

coltura di 24 ore in presenza dei recettori decoy di IL-11 rispetto a coltura in assenza dei recettori decoy di IL-11.

Esempio 17: Inibizione di fibrosi in vivo utilizzando i recettori decoy di IL-11

L'utilità terapeutica dei recettori decoy di IL-11 è stata dimostrata in modelli murini *in vivo* di fibrosi per vari tessuti diversi.

17.1 Fibrosi cardiaca

Una pompa è stata impiantata ed i topi sono stati trattati con AngII (2 mg/kg/giorno) per 28 giorni.

I recettori decoy di IL-11 D11R1 o D11R2 sono stati somministrati a gruppi diversi di topi mediante somministrazione endovenosa. Al termine dell'esperimento, il contenuto di collagene viene valutato negli atri dei topi utilizzando un kit di analisi basato su idrossiprolina calorimetrica ed il livello di espressione di RNA dei marcatori di fibrosi Colla2, α SMA (ACTA2) e fibronectina (Fn1) è stato analizzato mediante qPCR.

Topi trattati con i recettori decoy di IL-11 hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto cardiaco rispetto a controlli non trattati/trattati con veicolo, come è evidenziato dalla ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

17.2 Fibrosi renale

Un modello murino di fibrosi renale viene stabilito, in cui la fibrosi è indotta mediante iniezione intraperitoneale di acido folico (180 mg/kg) in veicolo (NaHCO₃ 0,3M); ai topi di controllo è stato

somministrato il solo veicolo.

I recettori decoy di IL-11 D11R1 o D11R2 sono stati somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione intraperitoneale. I reni sono stati rimossi il giorno 28, pesati ed o fissati in formalina tamponata neutra al 10% per tricromo di Masson e colorazione Sirius oppure congelati in modo rapido per l'analisi di collagene, RNA e studi di proteine.

L'RNA totale viene estratto dal rene congelato in modo rapido utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen) ed il procedimento Qiagen TissueLyzer seguito da purificazione in colonna RNeasy (Qiagen). Il cDNA viene preparato utilizzando un kit di sintesi iScript™ cDNA, in cui ciascuna reazione conteneva 1 µg di RNA totale, secondo le istruzioni del fabbricante. Analisi di espressione genica mediante RT-PCR quantitativa viene compiuta su campioni in triplicato con TaqMan (Applied Biosystems) o tecnologia fast SYBR green (Qiagen) utilizzando StepOnePlus™ (Applied Biosystem) su 40 cicli. I dati di espressione sono stati normalizzati al livello di espressione di mRNA di GAPDH ed il procedimento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ è stato utilizzato per calcolare il numero di volte di variazioni. I reni congelati in modo rapido sono stati sottoposti ad idrolisi acidi mediante riscaldamento in HCl 6M ad una concentrazione di 50 mg/ml (95°C, 20 ore). La quantità di collagene totale nell'idrolizzato viene quantificata sulla base della rivelazione colorazione di idrossiprolina utilizzando il kit di analisi di collagene totale Quickzyme (Quickzyme Biosciences) secondo le istruzioni del fabbricante.

I topi trattati con i recettori decoy di IL-11 hanno una risposta fibrotica ridotta nel tessuto renale rispetto a controlli non trattati/trattati con il veicolo, come è evidenziato dalla ridotta espressione di marcatori della fibrosi.

17.3 Fibrosi polmonare

I topi vengono trattati mediante somministrazione intratracheale di bleomicina al giorno 0 per stabilire una risposta fibrotica nel polmone (fibrosi polmonare).

I recettori decoy di IL-11 D11R1 o D11R2 vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa. I topi vengono sacrificati al giorno 21 ed analizzati per differenze in marcatori di fibrosi.

I topi trattati con i recettori decoy di IL-11 hanno ridotta risposta fibrotica nel tessuto polmonare rispetto a controlli non trattati/trattati con veicolo, come è evidenziato dalla ridotta espressione dei marcatori della fibrosi.

17.4 Fibrosi cutanea

I topi vengono trattati mediante somministrazione sottocutanea di bleomicina al giorno 0 per stabilire la risposta fibrotica nella pelle.

I recettori decoy di IL-11 D11R1 o D11R2 vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa. I topi vengono sacrificati al giorno 21 ed analizzati per le differenze dei marcatori della fibrosi.

I topi trattati con i recettori decoy di IL-11 hanno una ridotta

risposta fibrotica nel tessuto cutaneo rispetto a controlli non trattati/trattati con veicolo, come è evidenziato da ridotta espressione di marcatori di fibrosi.

17.5 Fibrosi oculare

I topi hanno subito la procedura di trabeculectomia come descritto nell'Esempio 7.6 precedente per iniziare una risposta di risanamento di ferita nell'occhio.

I recettori decoy di IL-11 D11R1 o D11R2 vengono somministrati a gruppi diversi di topi mediante iniezione endovenosa e la fibrosi viene monitorata nel tessuto oculare.

I topi trattati con i recettori decoy di IL-11 hanno una ridotta risposta fibrotica nel tessuto cutaneo rispetto a controlli non trattati/trattati con veicolo, come è evidenziato da ridotta espressione di marcatori di fibrosi.

17.6 Altri tessuti

L'effetto del trattamento con i recettori decoy di IL-11 D11R1 o D11R2 sulla fibrosi viene anche analizzato in modelli murini di fibrosi per altri tessuti, come fegato, rene, intestino e viene anche analizzato in un modello relativo alla fibrosi su organi multipli (cioè sistemica).

La risposta fibrotica viene misurata e confrontata fra topi trattati con i recettori decoy di IL-11 e topi non trattati o controlli trattati con veicolo. I topi trattati con i recettori decoy di IL-11 hanno ridotta risposta fibrotica rispetto ai controlli non trattati/trattati con veicolo, come è evidenziato dalla ridotta

espressione di marcatori della fibrosi.

Esempio 18: Biomarcatori genetici per la risposta di IL-11

In aggiunta a misurare la proteina IL-11 come potenziale biomarcatore per la fibrosi, abbiamo sviluppato un'analisi che può predire lo stato di secrezione di IL-11 in esseri umani. Questa analisi potrebbe essere utilizzata come accompagnamento diagnostico in analisi cliniche correlate a IL-11.

Abbiamo dapprima generato dati RNA-seq (Figura 16) e determinato il genotipo di 69 individui fatti corrispondere etnicamente (cinesi) nella coorte utilizzando un array SNP basato su ibridizzazione di sonda fluorescente fornita da Illumina (HumanOmniExpress 24).

Abbiamo quindi compiuto analisi eQTL di legame a livello dell'intero genoma per valutare se polimorfismi di nucleotide singolo (SNP) influenzano i livelli di trascritti di RNA di IL-11 o di IL-11R in fibroblasti non stimolati, in fibroblasti stimolati con TGFβ1 (5 ng/ml, 24 ore). Abbiamo anche testato se l'aumento di IL-11 in seguito a stimolazione con TGFβ1 (= risposta) fosse dipendente dal genotipo.

Dapprima abbiamo quantificato il conteggio di lettura sia per IL-11 che per IL-11Ra in tutti gli individui e trasformato questi conteggi usando l'approccio di stabilizzazione di varianza (VST) del procedimento DESeq2 (Love et al., Genome Biology, 2014, 15:550). Abbiamo quindi considerato l'espressione di IL-11 e di IL-11RA in cellule non stimolate (VST_{unstim}) e stimolate (VST_{stim}). Per valutare l'aumento di IL-11, abbiamo anche calcolato il delta nell'espressione

come $VST_{stim} - VST_{unstim}$. Abbiamo corretto i valori dell'espressione usando covariati come lotti di libreria di sequenza di RNA, punteggio di qualità RIN di RNA, concentrazione di libreria, dimensioni di frammenti di libreria, età, sesso, prima delle analisi. Coppie di SNP ed espressione di trascritto o delta espressione, sono state analizzate utilizzando l'approccio di matrice eQTL (Andrey A., Shabalina, *Bioinformatics*, 15 maggio 2012; 28(10):1353-1358).

Non abbiamo osservato variazioni in *cis* o *trans* che influenzassero significativamente l'espressione di IL-11 in cellule non stimulate. Tuttavia abbiamo rivelato SNP distanti che regolavano l'espressione in fibroblasti stimolati = fibrotici. Queste varianti stratificano la popolazione fra individui che esprimono bassi livelli di IL-11 e quelli che esprimono alte quantità di IL-11 nella fibrosi. Abbiamo rivelato anche varianti locali e distali che prevedevano l'aumento di espressione di IL-11 in risposta a TGF β 1. Queste varianti possono essere utilizzate per stratificare gli individui in risponditori alti e bassi nella fibrosi.

Gli SNP identificati sono mostrati nelle Figure da 33 a 35 ed i dati acclusi sono mostrati nelle Figure 36 e 37.

ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> Singapore Health Services Pte Ltd
National University of Singapore

<120> Trattamento della fibrosi

<130> RIC/FP7164916

<150> GB1522186.4

<151> 16-12-2015

<160> 77

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 2381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

actgccgcgg	ccctgctgct	cagggcacat	gcctccoctc	cccaggccgc	ggcccagctg	60
accctcgggg	ctccccggc	agcggacagg	gaagggttaa	aggcccccgg	ctccctgccc	120
cctgccctgg	ggaaccctg	gcctgtggg	gacatgaact	gtgtttgccg	cctggtcctg	180
gtcgtgctga	gcctgtggcc	agatacagct	gtcgcctctg	ggccaccacc	tggccccctc	240
cgagtttccc	cagaccctcg	ggccgagctg	gacagcaccg	tgctcctgac	ccgctctctc	300
ctggcgggaca	cgcggcagct	ggctgcacag	ctgagggaca	aattcccagc	tgaccggggac	360
cacaacctgg	attccctgcc	caccctggcc	atgagtgcgg	gggcaactggg	agctctacag	420
ctcccagggtg	tgctgacaag	gctgcgagcg	gacctactgt	cctacctgcg	gcacgtgcag	480
tggctgcgcc	gggcagggtg	ctcttccctg	aagaccctgg	agcccgagct	gggcaccctg	540
caggcccggac	tggaccggct	gctgcgcccg	ctgcagctcc	tgatgtcccg	cctggccctg	600
ccccagccac	ccccggacc	gccggcgccc	ccgctggcgc	ccccctctc	agcctggggg	660
ggcatcaggg	ccgcccacgc	catcctgggg	gggctgcacc	tgacacttga	ctgggcccgtg	720
aggggactgc	tgctgctgaa	gactcggctg	tgaccocgggg	occaaagcca	ccaccgtcct	780
tccaaagcca	gatcttattt	atctatttat	ttcagtactg	ggggcgaaac	agccaggtga	840
tccccocgcc	attatctccc	cctagttaga	gacagtcctt	ccgtgaggcc	tggggggcat	900
ctgtgocctta	tttatactta	tttatttcag	gagcaggggt	gggaggcagg	tggactcctg	960
ggtccccgag	gaggagggga	ctggggctcc	ggattcttgg	gtctccaaga	agtctgtcca	1020
cagacttctg	ccctggctct	tccccatcta	ggcctgggca	ggaacatata	ttatttattt	1080
aagcaattac	tttcatggt	ggggtgggga	cggaggggaa	agggaaacct	gggtttttgt	1140
acaaaaatgt	gagaaaocct	tgtgagacag	agaacagggga	attaaatgtg	tcatacatat	1200
ccacttgagg	gcgatttgtc	tgagagctgg	ggctggatgc	ttgggtaact	ggggcagggc	1260

agggtggaggg gagacctcca ttcaggtgga ggtcccagat gggcggggca gcgactggga	1320
gatgggtcgg tcaccagac agctctgtgg aggcagggtc tgagccttgc ctggggcccc	1380
gcactgcata gggccttttg tttgtttttt gagatggagt ctcgctctgt tgcctagget	1440
ggagtgcagt gaggcaatct gaggtcactg caacctccac ctcccgggtt caagcaattc	1500
tcctgcctca gcctccgat tagctgggat cacaggtgtg caccaccatg cccagctaata	1560
tatttatttc ttttgtattt ttagtagaga cagggtttca ccatgttggc caggctgggt	1620
tcgaactcct gacctcaggt gatcctcctg cctcggcctc ccaaagtgtt gggattacag	1680
gtgtgagcca ccacacctga cccatagggtc ttcaataaat atttaattgga aggttccaca	1740
agtcaccttg tgatcaacag taccogtatg ggacaaagt gcaagggtcaa gatggttcat	1800
tatggctgtg ttcaccatag caaactggaa acaatctaga tatccaacag tgagggttaa	1860
gcaacatggt gcatctgtgg atagaacgcc acccagccgc ccggagcagg gactgtcatt	1920
cagggaggct aaggagagag gcttgcttgg gatatagaaa gatatcctga cattggccag	1980
gdatggtggc tcacgcctgt aatcctggca ctttgggagg acgaagcgag tggatcactg	2040
aagtccaaga gttcgagacc ggctcggag acatggcaaaa accctgtctc aaaaaagaaa	2100
gaatgatgtc ctgacatgaa acagcaggct acaaaaaccac tgcatgctgt gatcccaatt	2160
ttgtgttttt ctttctatat atggattaaa acaaaaatcc taaagggaaa tacgccaaaa	2220
tgttgacaat gactgtctcc aggtcaaagg agagaggtgg gattgtgggt gacttttaata	2280
gtgtatgatt gtctgtattt tacagaattt ctgccatgac tgtgtatttt gcatgaoaca	2340
ttttaaaaat aataaaact attttttagaa taacagaaaa a	2381

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ccttcaaag ccgatctt 19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gcctggcag gaacalata 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cctgggcagg aacatata 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggttcattat ggctgtgt 19

<210> 6

<211> 1696

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gctgtagctg gtgagaggaa gtccctagagg ctatggadac tctgctgctg ggatcaccca	60
gatgagcagc agctgctcag ggctgagcag ggtccctggctg gccgtggcta cagccctggt	120
gtctgcctcc tccccctgcc cccaggcctg gggcccccca ggggtccagt atgggcagcc	180
agggaggtcc gtgaagctgt gttgtcctgg agtgactgcc ggggaaccag tgtcctggtt	240
tcgggatggg gagccaaagc tgctccaggg acctgactct gggctagggc atgaactggt	300
cctggcccag gcagacagca ctgatgagg cacctacatc tgccagaacc tggatggtgc	360
acttgggggc acagtgacc tgccagctgg ctaccctcca gcccgccctg ttgtctcctg	420
ccaagcagcc gactatgaga acttctcttg cacttggagt cccagccaga tcagcggttt	480
accacccgc tacctcacot cctacaggaa gaagacagtc ctaggagctg atagccagag	540
gaggagtcca tccacagggc cctggccatg cccacaggat cccctagggg ctgcccgctg	600
tgttgtccac ggggctgagt tctggagcca gtaccggatt aatgtgactg aggtgaacct	660
actgggtgcc agcacacgcc tgctggatgt gagcttgca agcatcttgc gccctgacct	720
acccagggc ctgcgggtag agtcagtacc aggttacctc cgacgcctgc gagccagctg	780
gacataccct gcctcctggc cgtgccagcc cacttccctg ctcaagttcc gtttgagta	840
ccgtccggcg cagcatccag cctgggtccac ggtggagcca gctggactgg aggaggtgat	900
cacagatgct gtggctgggc tgcccatgc tgtacgagtc agtgcccggg actttctaga	960
tgctggcacc tggagcacct ggagcccggg gccctgggga actccgagca ctgggacct	1020
accaaaggag ataccagcat ggggccagct acacacgcag ccagaggtgg agcctcaggt	1080
ggacagccct gctcctcaa ggcctcct ccaaccacac cctcggctac ttgatcacag	1140
ggactctgtg gagcaggtag ctgtgctggc gtctttggga atcctttctt tctgggact	1200
ggtggctggg gccctggcac tggggctctg gctgaggctg agacggggtg ggaaggatgg	1260
atccccaaag cctgggttct tggcctcagt gattccagtg gacagggctc caggagctcc	1320

```

aaacctgtag aggacccagc agggcttcgg cagattccac ctataattct gtcttgctgg 1380
tgtggataga aaccaggcag gacagtagat ccctatggtt ggatctcagc tgggaagttct 1440
gtttggagcc catttctgtg agaccctgta tttcaaattt gcagctgaaa ggtgcttgta 1500
cctctgattt caccacagag ttggagttct gctcaaggaa cgtgtgtaat gtgtacatct 1560
gtgtccatgt gtgaccatgt gtctgtgaag gccagggaac atgtattcct ctgcatgcat 1620
gtatgtaggt gcctgggagt gtgtgtggtc cttgctctgg ccctttccct tgcagggttg 1680
tgcagggtgtg aataaa 1696

```

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggaccatacc aaaggagat 19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gcgtcttgg gaatcctt 19

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gcaggacagt agatccct 18

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gctcaaggaa cgtgtgtaa 19

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> n = deossitimidina

<400> 11

ccuuccaaag ccagauuun n 21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deossitimidina

<400> 12
gccugggcag gaacauauan n 21

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deossitimidina

<400> 13
ccugggcagg aacauauaun n 21

<210> 14
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deossitimidina

<400> 14
gguucuuau gcuguguun n 21

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deossitimidina

<400> 15
ggaccuacc aaaggagaun n 21

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deossitimidina

<400> 16
gcgucuuugg gaaucuuun n 21

<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deossitimidina

<400> 17
gcaggacagu agauccuan n 21

<210> 18
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deossitimidina

<400> 18
gcucaaggaa cguguguaan n 21

<210> 19
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = G o A

<400> 19
gtaagggatg tgaatgggt actgangaaa gagcctggat gcagagccag c 51

<210> 20
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C o T

<400> 20
ttgataactc cagcatctgg atcacngtgg gattagcacc tgtttgtatt t 51

<210> 21
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C o T

<400> 21
gtgtgattgc ttaaaaaaaaa ctactnacat tgttttgaat cacacctcac a 51

<210> 22
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T o C

<400> 22
gctcagctaa tcaatgacca gtctcnitaa ttcttctaatt gcctatatgg t 51

<210> 23
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = A o G

<400> 23
gcagtgctca gaagagcagc agccantgac atttggggc tataagaggt a 51

<210> 24
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C o T

<400> 24
tgtccagtaa ataactaaca ttltangtgc aatgtatgac ataaatatgg g 51

<210> 25
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = G o A

<400> 25

gggtgaagtt tggaaacagg tatacnttgt gatgcaatcg tcagaaccaa g 51

<210> 26

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C o T

<400> 26

aaaccatagt atcatccttc ccaaanagtc aaccagga atcacagaga t 51

<210> 27

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C o T

<400> 27

taagagccta ttctctaatt ctgaangaa gaactcctct cccaagacat g 51

<210> 28

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C o T

<400> 28

agggtgaaca acacaaagg tgggngagg cgtgcaattt aaacatttc t 51

<210> 29

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C o A

<400> 29

tattagattt tgtgtggat tcatngtia cattgttac cagcccaat t 51

<210> 30
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

 <400> 30
 gattccagtt ccaagtcaca tcatnccag ctggaagacc tagggcaaaa g 51

 <210> 31
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G o A

 <400> 31
 accatgacgg tgcctcatt gcttnacca ttagtaatca tcattcatt c 51

 <210> 32
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

 <400> 32
 accgtgcaca tttgtcagc tccanccac cccctaccac tgccttata a 51

 <210> 33
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

 <400> 33
 gacacgalgt cttcagtcct cagcfnagct tggactgtga ggatggglca g 51

 <210> 34
 <211> 51
 <213> Homo sapiens

 <220>

<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C o T

<400> 34
ctctcaagtt tgcccagggg atacgnggga agtgcccctg gggggccgac c 51

<210> 35
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = G o T

<400> 35
ctggtctctt ccagctctgg tggctnccag tatttctgg gttggtcct c 51

<210> 36
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T o C

<400> 36
aacaaggtga cagaccaggg agtaangcct ctcaatgatg ccttgagagt c 51

<210> 37
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = G o A

<400> 37
cggcaggcag taggatggac tgcgngacg gcggccagca tgaatgaa a 51

<210> 38
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T o C

<400> 38
aagtaaggtg tcaaggaggc catgcncact ctgtagggtc taggaaagaa t 51

<210> 39
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T o C

<400> 39
atgcctgaaa gaaacaagag caaatngtct caggaggtag gtaataggat g 51

<210> 40
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = A o G

<400> 40
agcatattca ttgatttctt tacatncaaa tgctcctttt taagtgtca a 51

<210> 41
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26).. (26)
<223> n = A o G

<400> 41
tcagtagta ttccctgcatc agtgcntcct gcggttctc caacagtcag c 51

<210> 42
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C o T

<400> 42
agtgaggcc clggaaccgg ggacngtga caatttcacc gtgtggcgag a 51

<210> 43
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

<400> 43
 tgccatataa tctcagggtg caacgnataa acaaggggtg atgccgaaga a 51

<210> 44
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G o A

<400> 44
 ctctgtcccc tcaactctt tctaentggt catgtccctt ctttagtcc t 51

<210> 45
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o C

<400> 45
 gcaacaaaaa tcttatacat caccanatgt ctgcttagcg gcagaattgc c 51

<210> 46
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

<400> 46
 gctaggtaaa ggactctgaa aatacngcaa catggaaaac atccagtctc c 51

<210> 47
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C

<400> 47
 tccatttggc cagtgcagca tagcngcat tgccaagggtg gtcttcccaa c 51

<210> 48
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

 <400> 48
 cglttaacaa agaagacact gagatngagg gcctggaagt gcclttcalt g 51

 <210> 49
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

 <400> 49
 ttctacgact ttttactgc ctacangagt cccaggagga agacttcaca a 51

 <210> 50
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G o T

 <400> 50
 gccaaatgtg lttgaaaatt ccatnngaag aatftatggt gaatgcatt t 51

 <210> 51
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

 <400> 51
 gaagattglt caagaaaagg cagagngcat gatgacaaca caaatgaag a 51

 <210> 52
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>

<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = A o G

<400> 52
cctgggacta tcccctggcc gggcncaca catgtccct gtgaccagg a 51

<210> 53
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C o T

<400> 53
gctggctgtg aggagccgc gagaantccc tgctgtcc atgaattat c 51

<210> 54
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = G o T

<400> 54
aaggtaaga gtggaaaag gcagangatc aggaaaaata actaatggg a 51

<210> 55
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = A o C

<400> 55
ggcttaataa aaggaattag agagcctcc ctctctcca acatctttt c 51

<210> 56
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = G o A

<400> 56
tggctgtgc tctccttga cactctctg tggacatcac aggagggaac a 51

<210> 57
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

 <400> 57
 gtgcgtatat gtgtfacaag tggctnctgt tgaccgcctg cctgtggaaa g 51

 <210> 58
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o C

 <400> 58
 gcctcgggtg ctgaccgggg gtgcctttgc tgggottagc aggccgggct t 51

 <210> 59
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

 <400> 59
 tgatgtcca catcctgtat aggaancagg tgatgtggaa atgagtcaga c 51

 <210> 60
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

 <400> 60
 catgaaaacc cotcagatgg taccaanaat atagacaatt gatccagaga g 51

 <210> 61
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = T o C

<400> 61

gtcccagcta ctcacacagg aggaatngcag gagttgaaa ccagcctgtg c 51

<210> 62

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = T o C

<400> 62

caccctcagg gctctcctt gacccntctc tcacccccgg gacctccctg c 51

<210> 63

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = T o C

<400> 63

gcaggtctgt gttccttgt atgttncctt gctacaggca ctctcagct t 51

<210> 64

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C o A

<400> 64

gtcagttgt gaacaggtaa aatcanaatg ctcatgtct ctacagggaa a 51

<210> 65

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = G o A

<400> 65

agccaattcg tcagtgaatg aggcanaaaa attgtaaaa agaaggaaag t 51

<210> 66
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T o C

<400> 66
tacatagtag gottaagagc aaatgnctac ctttcctct gtttcaact c 51

<210> 67
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T o G

<400> 67
gtgggtggf ttgttcccc ttaanggtg ccaattaatg acagattca t 51

<210> 68
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = A o G

<400> 68
gccccggta caagaatggc aaaacntta ttcggcatta acaatgtgla a 51

<210> 69
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T o C

<400> 69
gotcagctaa tcaatgacca gtctcntaa ttctctaataat gcctatatgg t 51

<210> 70
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = G o A

<400> 70

gtaagggatg tgaatcgggt actgangaaa gagcctggat gcagagccag c 51

<210> 71

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C o T

<400> 71

ttgataact cagcatctgg atcacngtgg gattagcatc tgttgtatt t 51

<210> 72

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C o T

<400> 72

gttgattgc taaaaaaaa ctactnecat tgtttgaat cacacctcac a 51

<210> 73

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = G o A

<400> 73

acttgcca ggctggcttt gcaacnatga gcccgagaag ctgltagaag t 51

<210> 74

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = A o G

<400> 74

gagacacaag agglgggcag gtctnngga ttaggagtt gggttcaagg c 51

<210> 75
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = G o A

<400> 75
tgagtctgtg aggagaaatg aacaantcta ccacagtcac ccagaatgag a 51

<210> 76
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C o T

<400> 76
atcagaaggc taaggaacca cctgtntaat agtctgggfc caaacacagg c 51

<210> 77
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = G o A

<400> 77
catcaataag aaaaacaaaa ataanttaat agaaaaatgc ataagagact t 51

* * * * *

R I V E N D I C A Z I O N I

1. Anticorpo che è in grado di legarsi all'interleuchina 11 (IL-11) o al recettore α di IL-11 (IL-11R α) ed inibire la segnalazione mediata da IL-11 per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi in un essere umano.

2. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo è in grado di prevenire o ridurre il legame di IL-11 ad un recettore di IL-11.

3. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui l'anticorpo è un anticorpo di legame di IL-11.

4. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui l'anticorpo è un anticorpo di legame di IL-11R α .

5. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui la fibrosi è fibrosi del cuore, del fegato, del rene o dell'occhio.

6. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la fibrosi è nel cuore ed è associata a disfunzione della muscolatura o proprietà elettriche del cuore o ispessimento

delle pareti o valvole del cuore.

7. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione di fibrosi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la fibrosi è nel fegato ed è associata a malattia cronica epatica o cirrosi epatica.

8. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la fibrosi è nel rene ed è associata a malattia renale cronica.

9. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la fibrosi è nell'occhio ed è fibrosi della retina, fibrosi epiretinica o fibrosi subretinica.

10. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui il metodo per il trattamento o prevenzione della fibrosi comprende somministrare detto anticorpo ad un soggetto in cui l'espressione di IL-11 o IL-11R è sovra-regolata.

11. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui il metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi comprende somministrare detto anticorpo ad un soggetto in cui si è determinato che l'espressione di IL-11 o di IL-11R è sovra-regolata.

12. Anticorpo per uso in un metodo per il trattamento o la

prevenzione della fibrosi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui il metodo per il trattamento o la prevenzione della fibrosi comprende determinare se l'espressione di IL-11 o IL-11R è sovra-regolata nel soggetto e somministrare detto anticorpo ad un soggetto in cui l'espressione di IL-11 o IL-11R è sovra-regolata.

Dogana, 7 novembre 2018

In fede

Il Mandatario


Ing. Marco Montebelli

USBM CPI 001

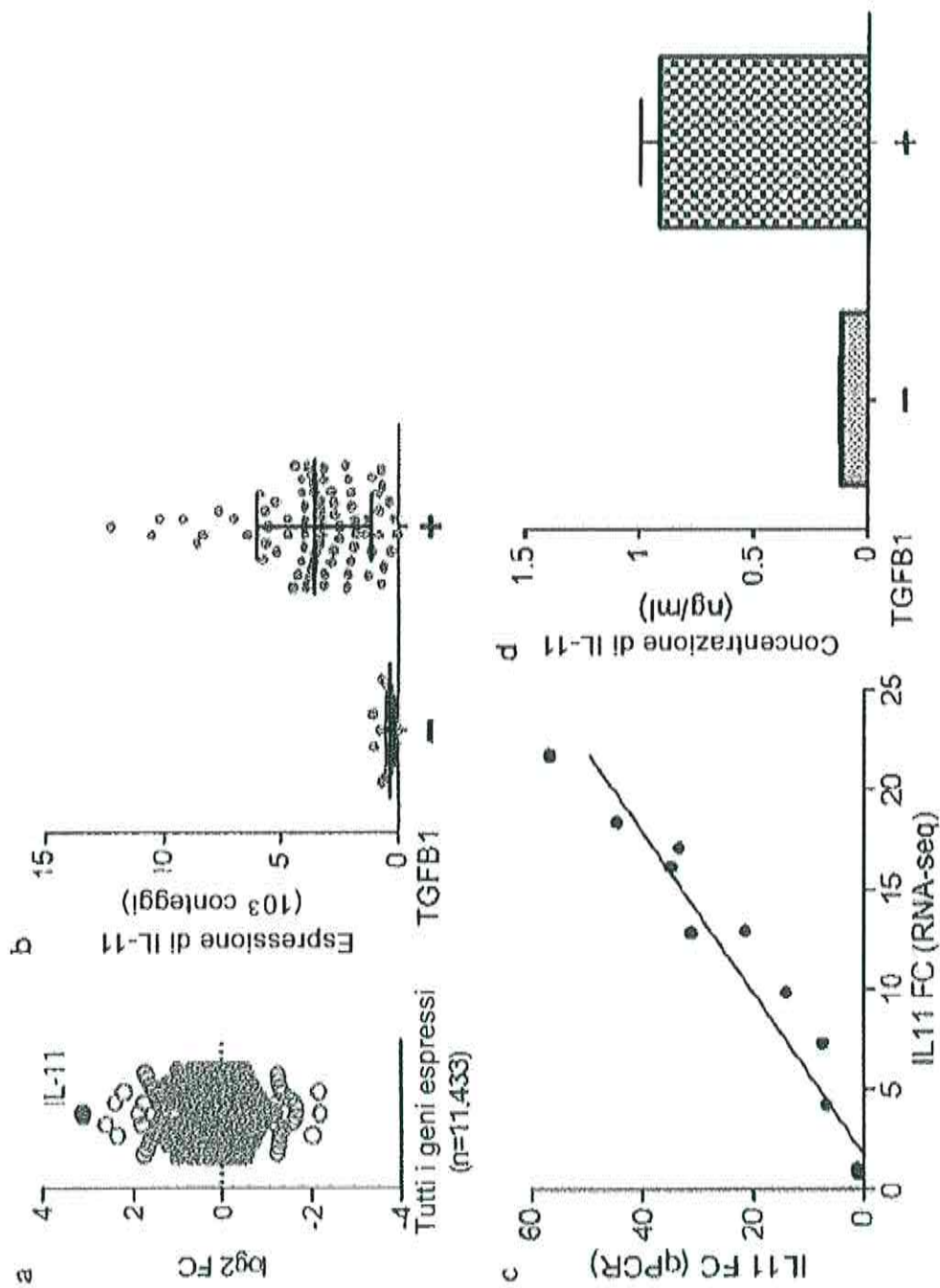


Figura 1

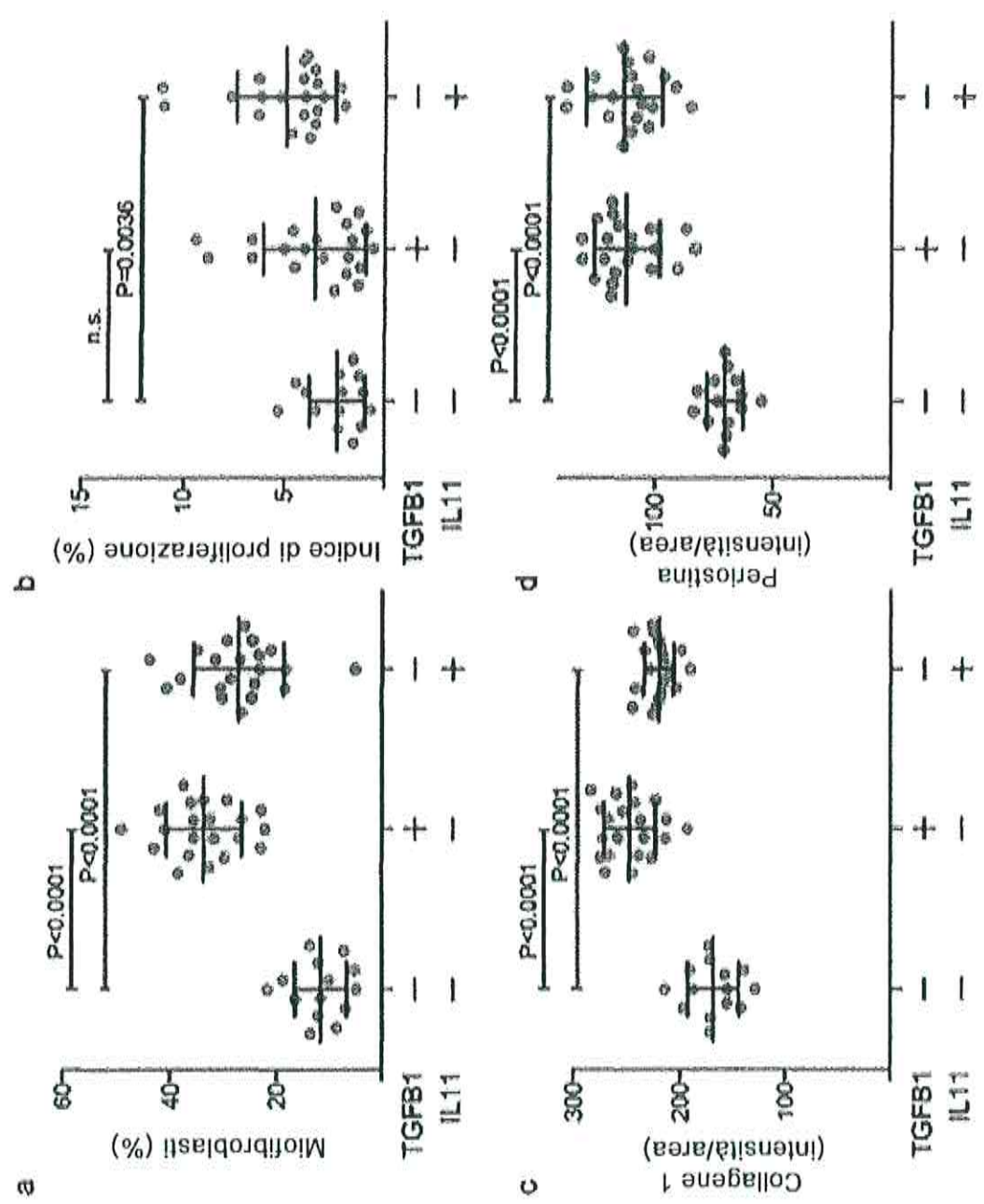


Figura 2

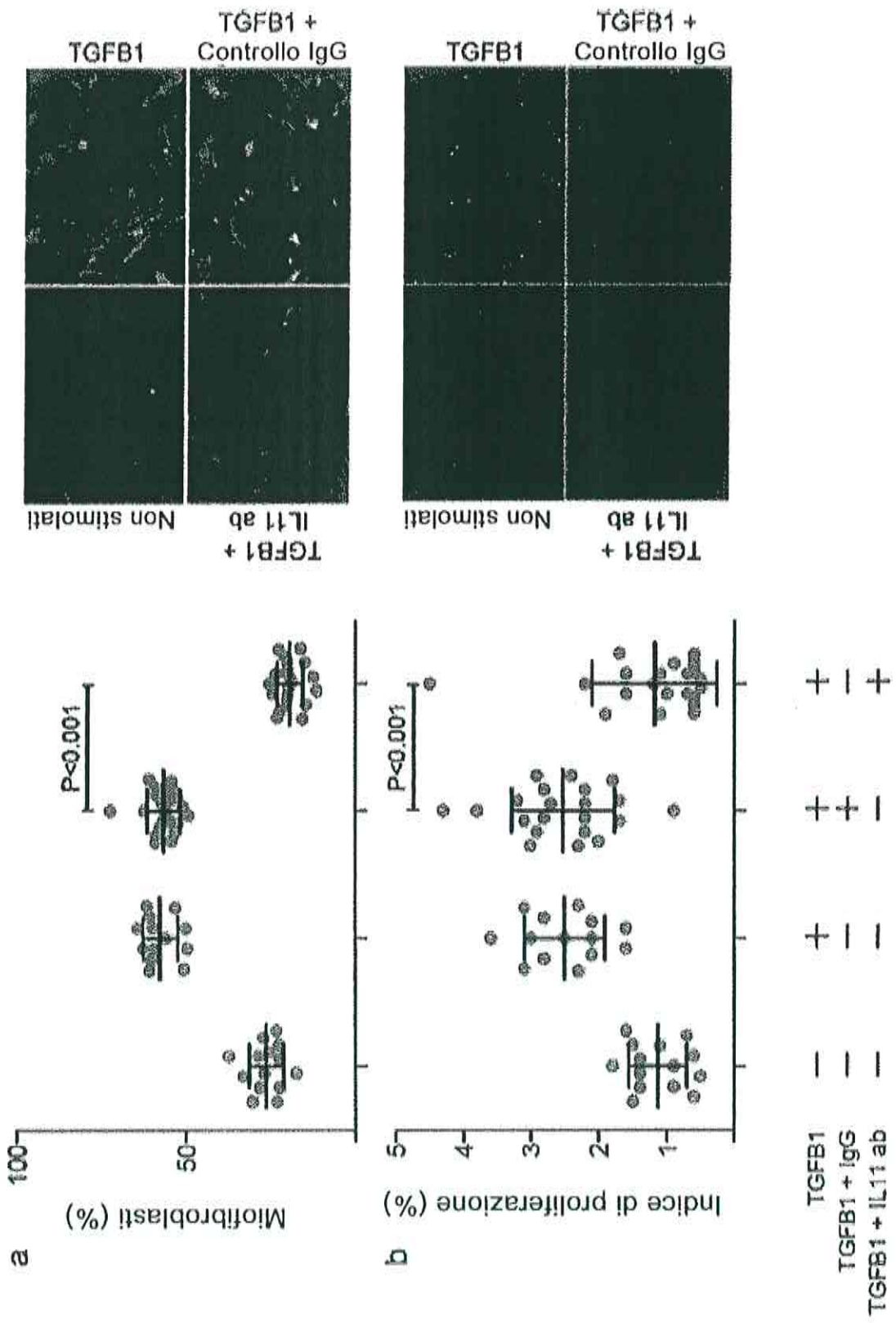


Figura 3a e 3b


 Ing. Marco Montebelli
 USBM CPI 001

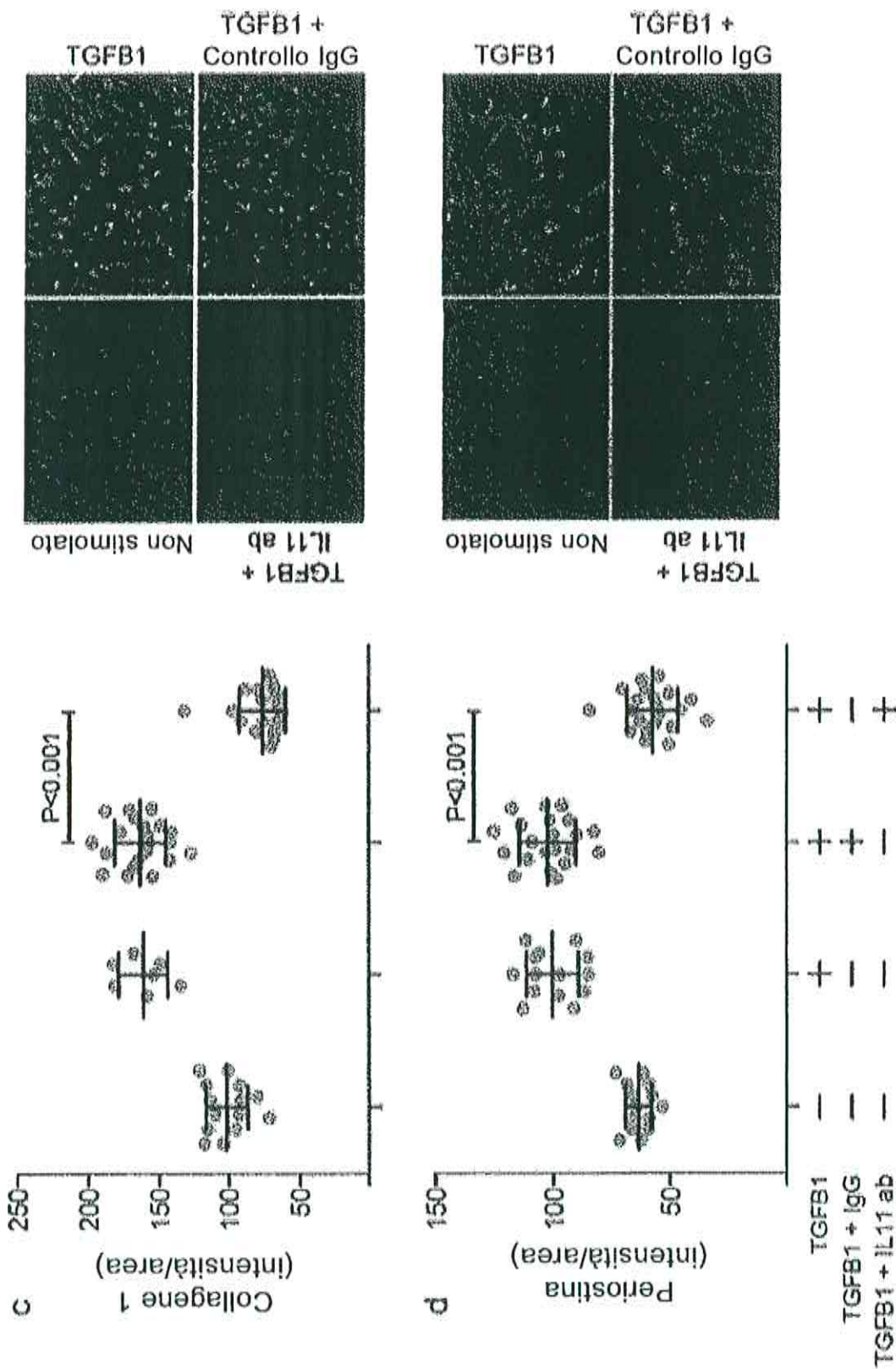


Figura 3c e 3d

3

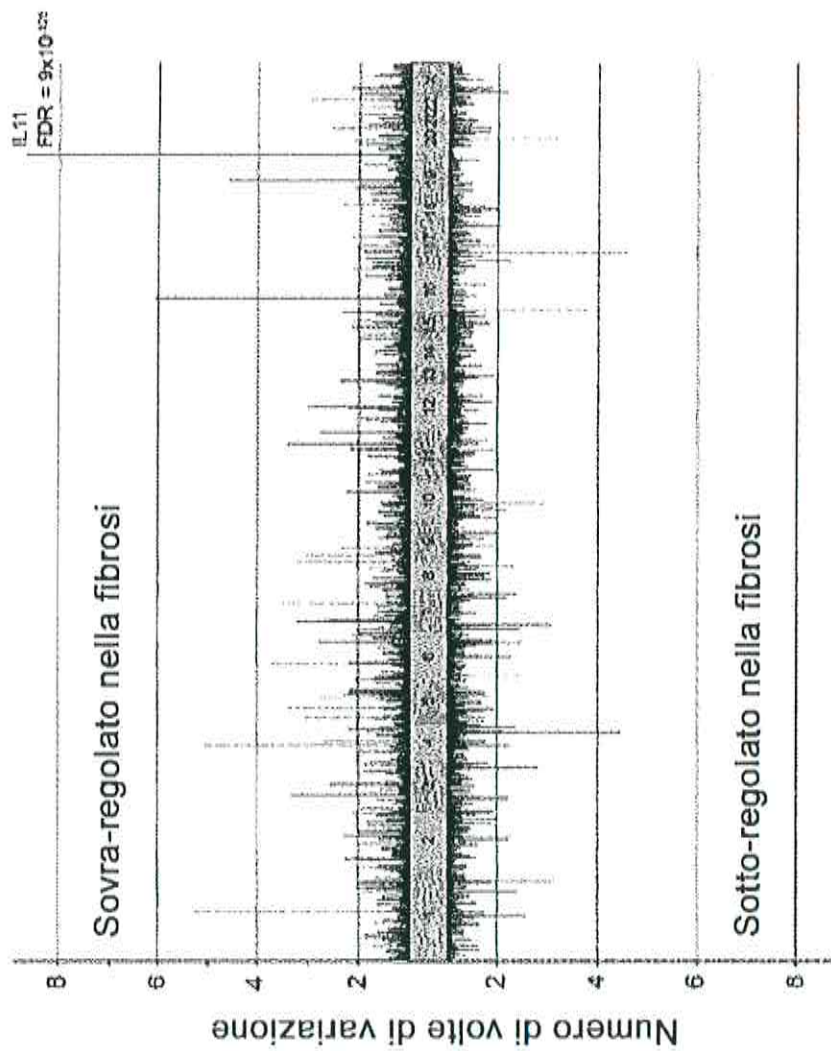


Figura 4a

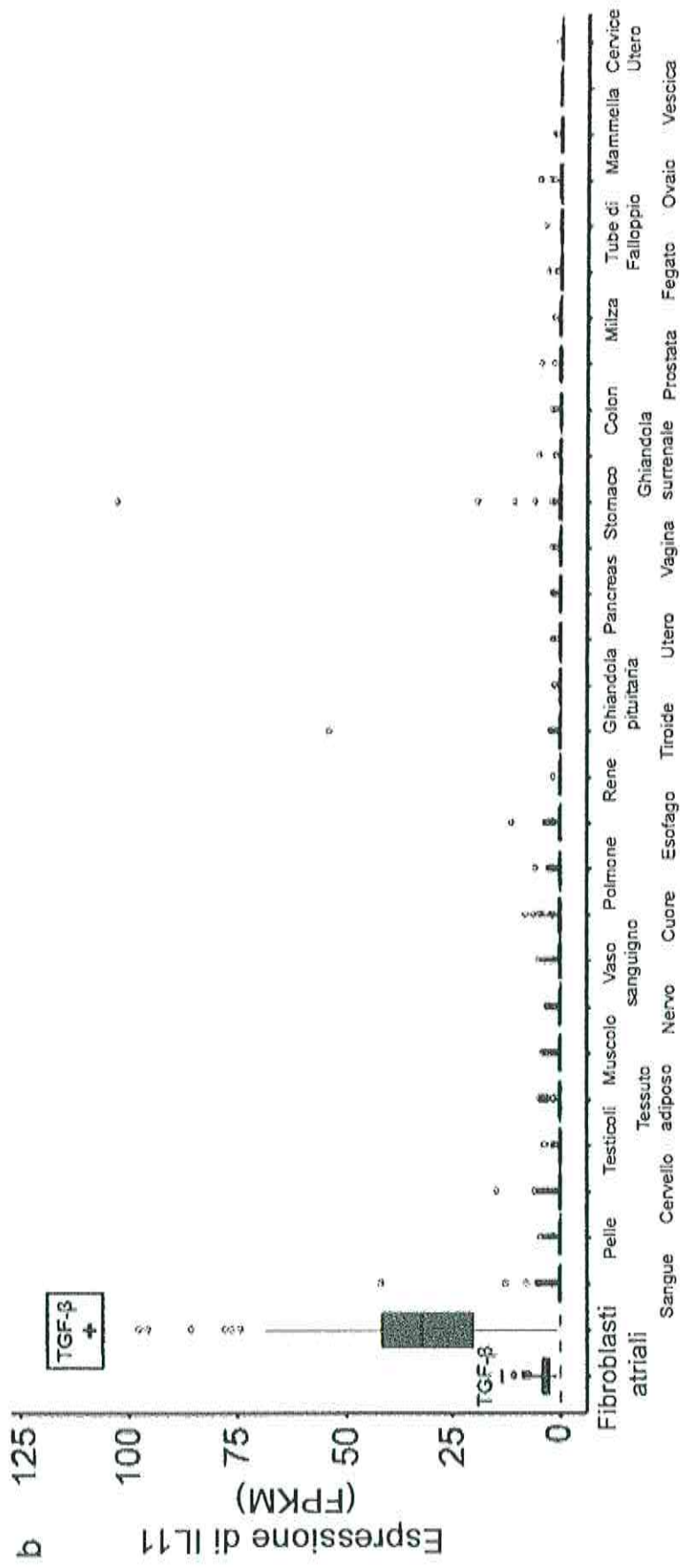


Figura 4b

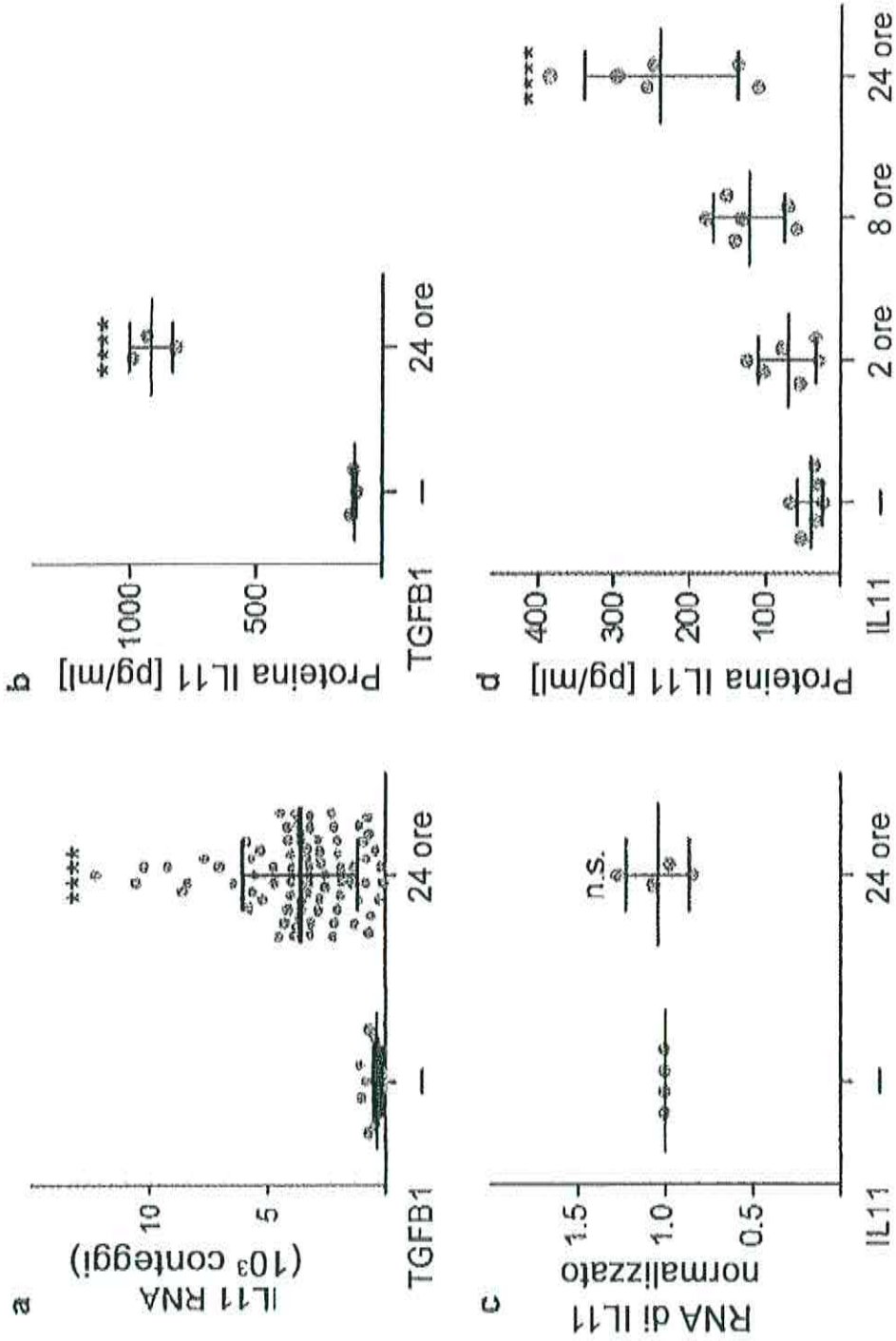


Figura 5

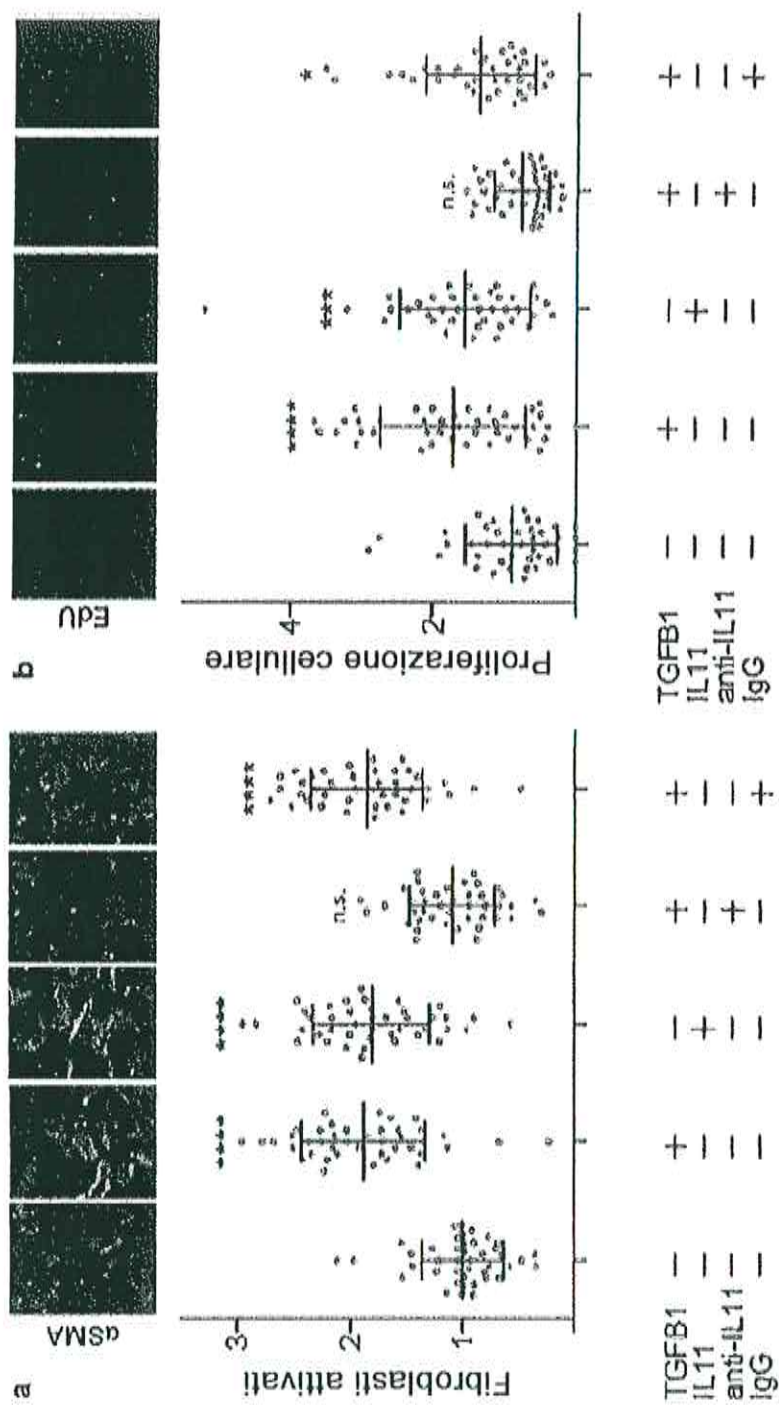


Figura 6a e 6b

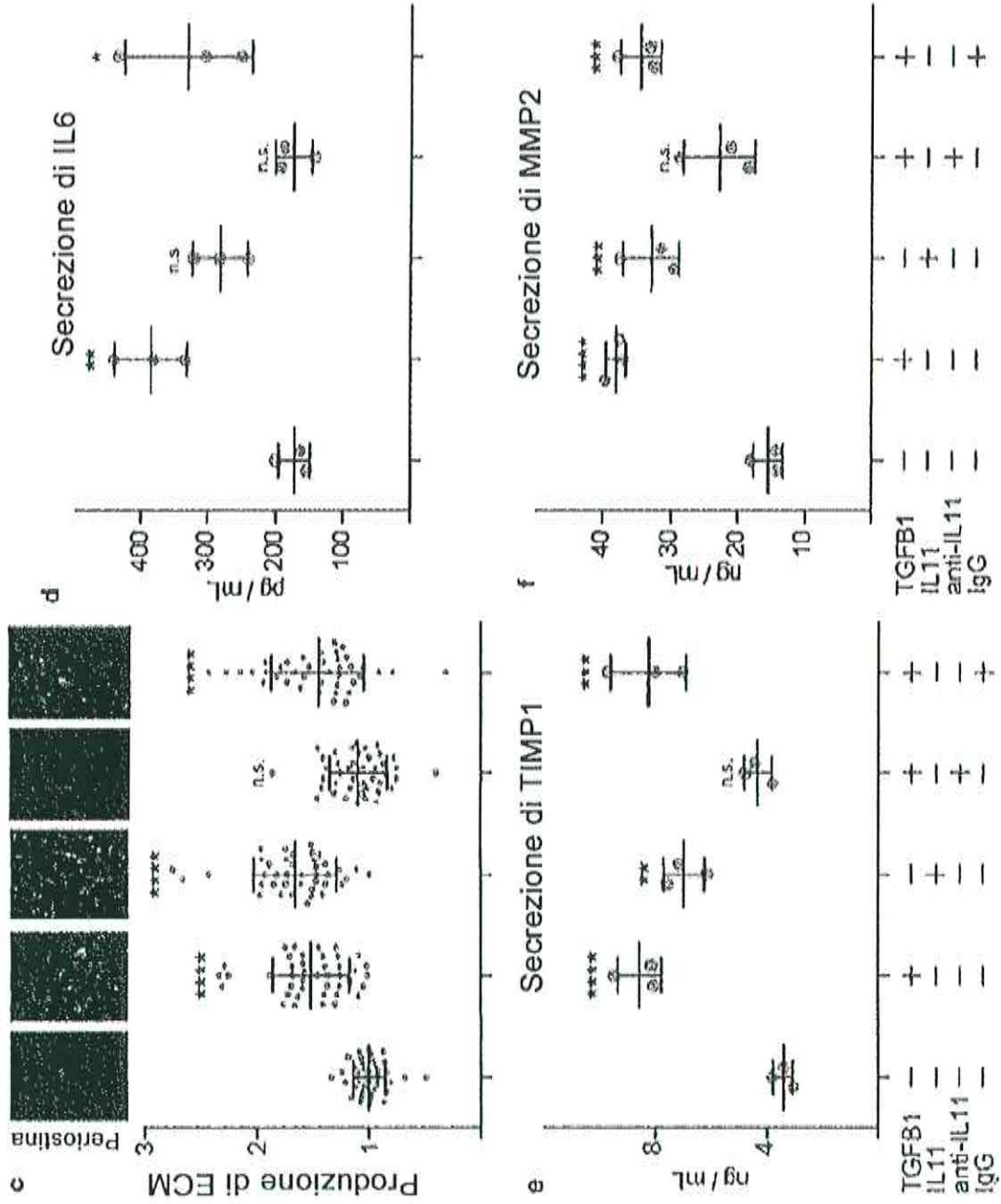


Figura 6c, 6d, 6e e 6f

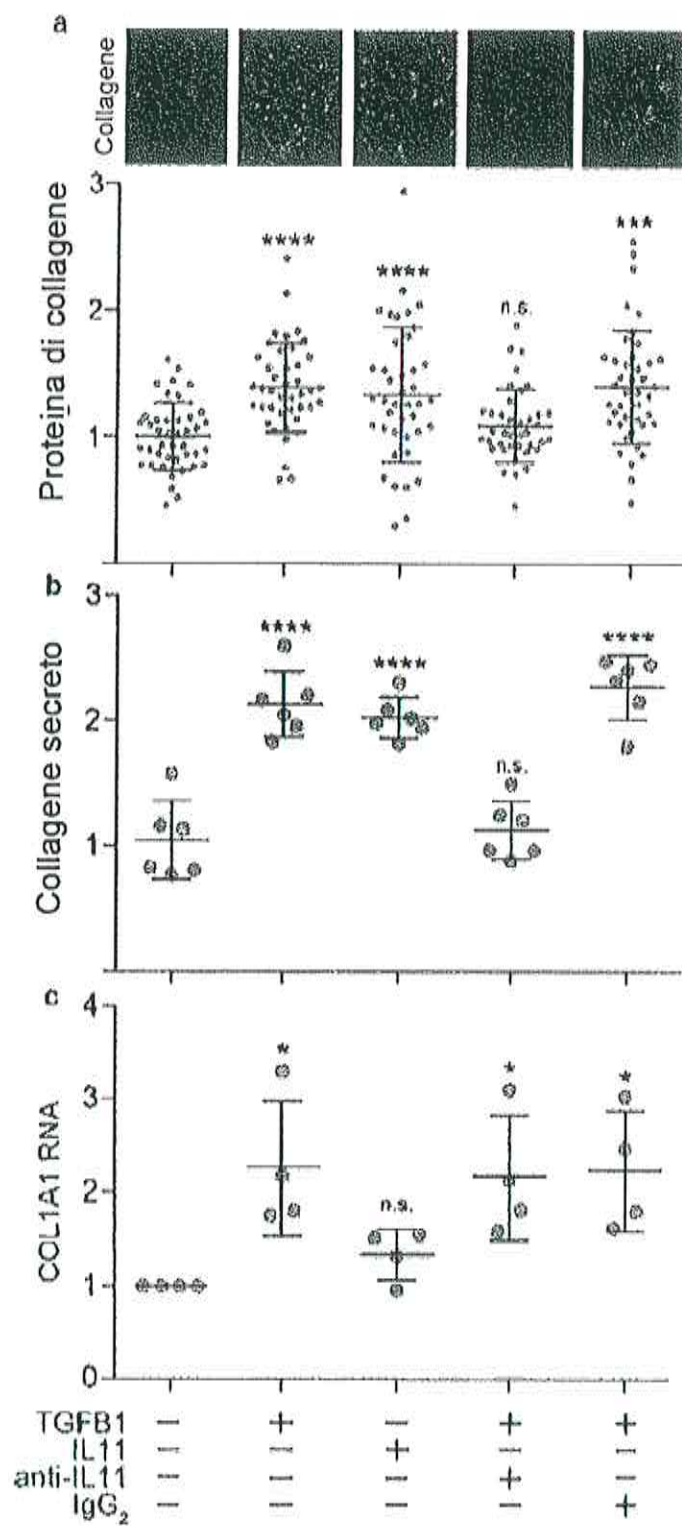


Figura 7

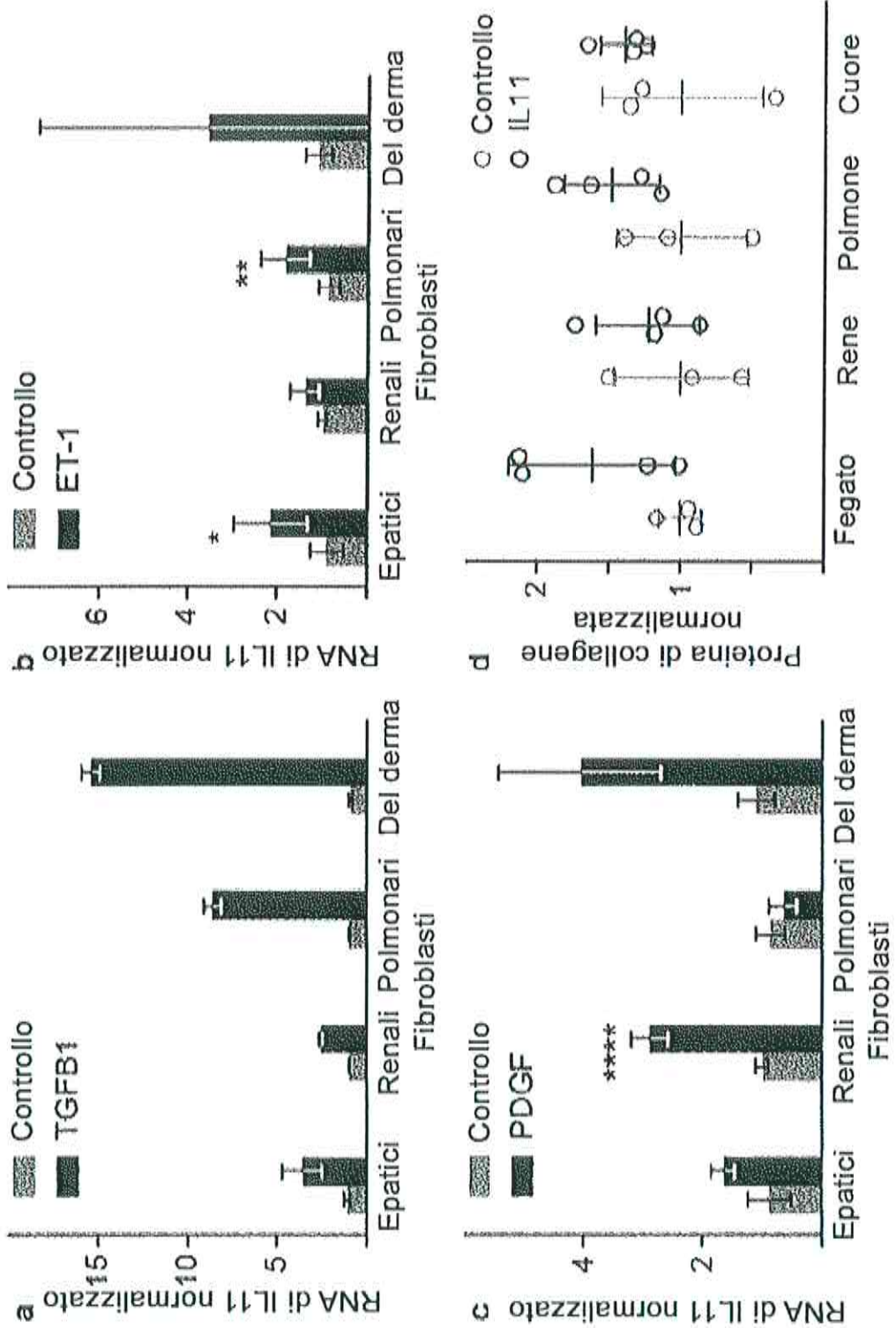


Figura 8a, 8b, 8c e 8d

Ing. Marco Montebelli
 USBM CPI 001

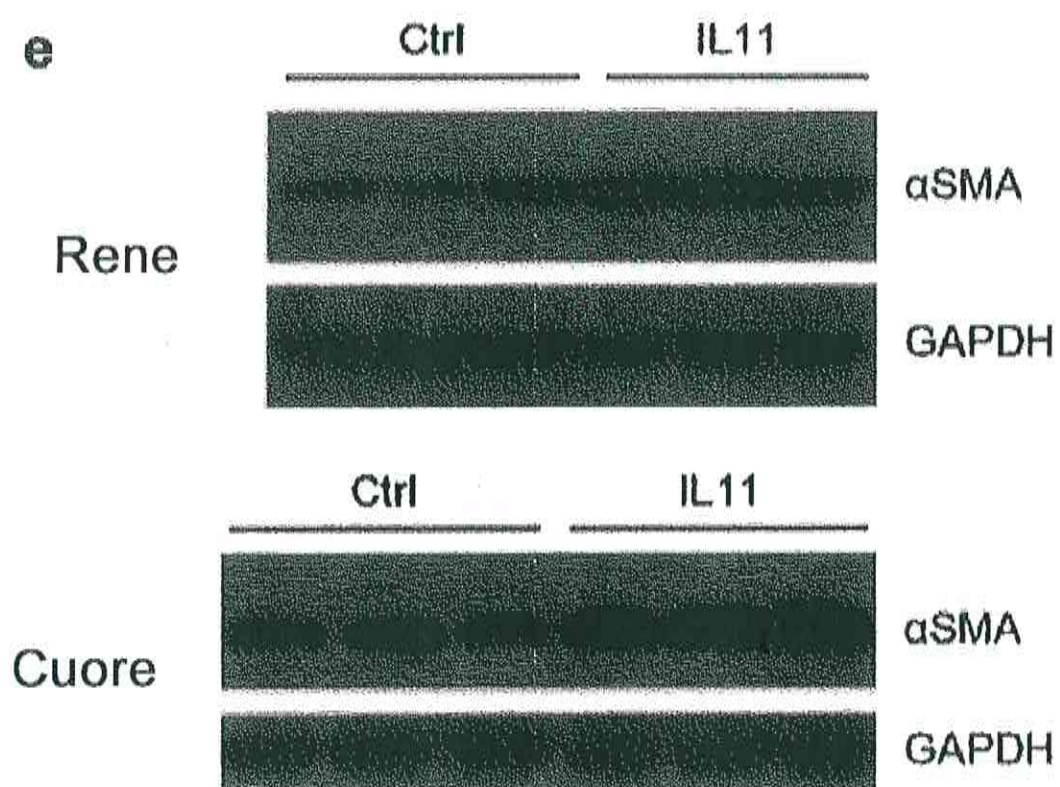


Figura 8e

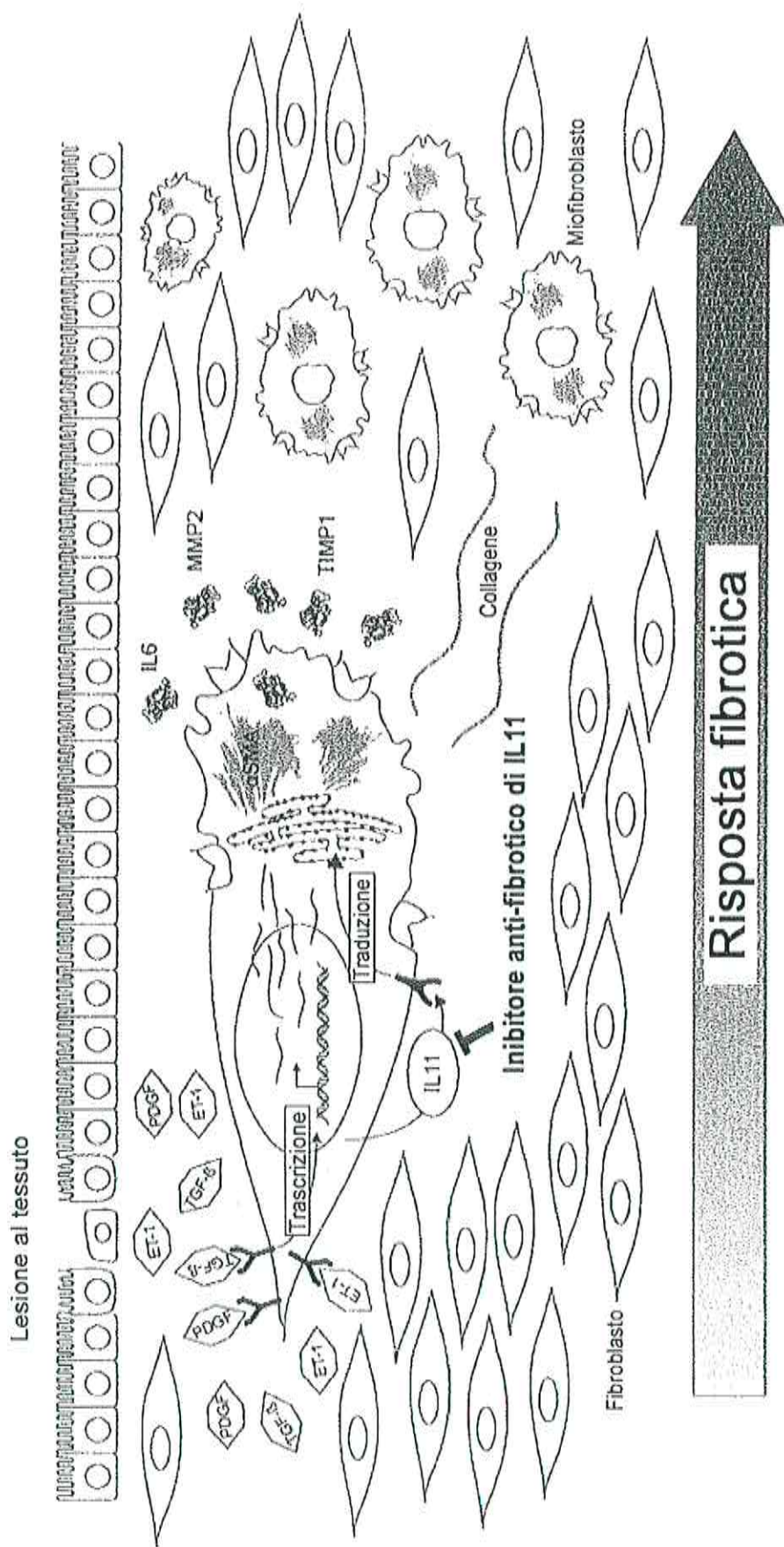


Figura 9

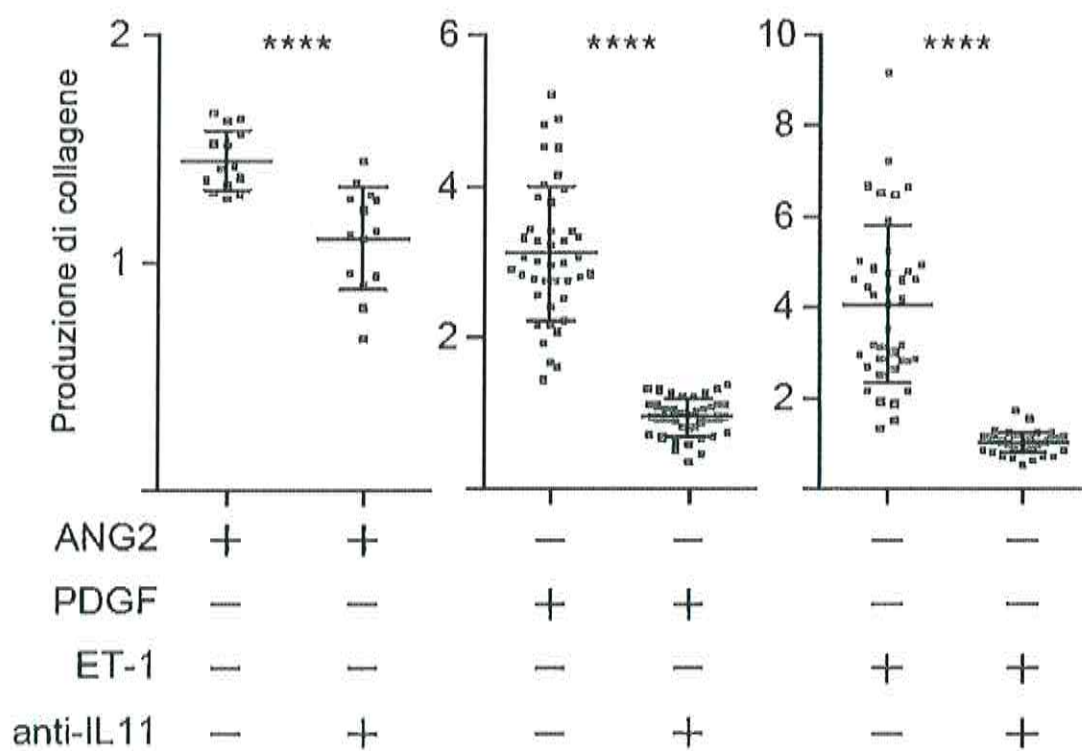


Figura 10

ACTGCCGCGGCCCTGCTGCTCAGGGCACATGCCTCCCCTCCCCAGGCCGCGGCCAGCTGACCCCTCGGGG
 CTCCCCCGGCAGCGGACAGGGAAGGGTTAAAGGCCCGGCTCCCTGCCCCCTGCCC TGGGAACCCCTG
 GCCCTGTGGGGACATGAACTGTGTTTGCCGCCTGGTCCTGGTCGTGCTGAGCCTGTGGCCAGATACAGCT
 GTCGCCCTGGGCCACCACCTGGCCCCCTCGAGTTTCCCCAGACCC TCGGGCCGAGCTGGACAGCACCG
 TGCTCCTGACCCGCTCTCTCTGCGGGACACGCGGCAGCTGGCTGCACAGCTGAGGGACAAA TTCCCAGC
 TGACGGGGACCACAACCTGGATTCCTTGCCACCCTGGCCATGAGTGCGGGGGCAC TGGGAGCTCTACAG
 CTCCCAGGTGTGCTGACAAGGCTGCGAGCGGACCTACTGTCTACCTGCGGCACGTGCAGTGGCTGCGCC
 GGGCAGGTGGCTCTTCCCTGAAGACCCTGGAGCCCAGCTGGGCACCCTGCAGGCCGACTGGACCGCT
 GCTGCGCCGGCTGCAGCTCCTGATGTCCCGCCTGGCCCTGCCCCAGCCACCCCGGACCCGCCGGCGCC
 CCGCTGGCGCCCCCTCCTCAGCCTGGGGGGGCATCAGGGCCGCCACGCCATCCTGGGGGGGCTGCACC
 TGACACTTGACTGGGCCGTGAGGGGACTGCTGCTGCTGAAGACTCGGCTGTGACCCGGGGGCCAAAGCCA
 CCACCGTCCCTCCAAAGCCAGATCTTTATTTATTTATTTT CAGTACTGGGGGCGAAAACGCCAGGTGA
 TCCCCCGCCATTATCTCCCCCTAGTTAGAGACAGTCCTTCCGTGAGGCCTGGGGGGCATCTGTGCCCTTA
 TTTATACTTATTTATTTT CAGGAGCAGGGGTGGGAGGCAGGTGGACTCCTGGGTCCCCGAGGAGGGGGA
 CTGGGGTCCCGGATTCTTGGGTCTCCAAGAAGTCTGTCCACAGACTTCTGCCCTGGCTCTTCCCCATCTA
 GCGCTGGCCAGCAACATATA TATTATTTAAGCAATTACTTTTCATGTTGGGGTGGGGACGGAGGGGAA
 AGGGAAGCCTGGGTTTTTGTACAAAAATGTGAGAAACCTTTGTGAGACAGAGAACAGGGAAT'AAATGTG
 TCATACATATCCACTTGAGGGCGATTGTCTGAGAGCTGGGGCTGGATGCTTGGGTAAC TGGGGCAGGGC
 AGGTGGAGGGGAGACC TCCATT CAGGTGGAGGTCCCGAGTGGGGCGGGGCAGCGACTGGGAGATGGGTCCG
 TCACCAGACACTCTGTGGAGGCAGGTCTGAGCCTTGCC TGGGGCCCCGCACTGCATAGGGCT'PTTG
 TTTGTTTTTTGAGATGGAGTCTCGCTCTGTTGCCTAGGCTGGAGTGCAGT GAGGCAATCTGAGGTCACTG
 CAACCTCCACC TCCCGGGTTCAAGCAAT TCTCCTGCCTCAGCCTCCCCGATTAGCTGGGATCACAGGTGTG
 CACCACCATGCCAGCTAATTATTTATTTCTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAGGGTTT CACCATGTTGGC
 CAGGCTGGTTTTCGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCTCCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAG
 GTGTGAGCCACCACACCTGACCCATAGGTCTTCAATAAATA TTAATGGAAGGTTCCACAAGTCACCCTG
 TGATCAACAGTACCCGTATGGGACAAAGCTGCAAGGTCAAGATGGTTCATTATGGGCTGTTT CACCATAG
 CAACTGGAAACAATCTAGATATCCAACAGT GAGGGTTAAGCAACATGGTGCATCTGTGGAT'AGAACGCC
 ACCAGCCGCCCCGGAGCAGGGACTGTCATT CAGGGAGGCTAAGGAGAGAGGCTTGCT TGGGATATAGAAA
 GATATCCTGACATTGGCCAGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCTGGCACTTTGGGAGGACGAAAGCGAG
 TGGATCACTGAAGTCCAAGAGTTCGAGACCGGCCTGCGAGACATGGCAAAAACCTGTCTCAAAAAAGAAA
 GAATGATGTCTGACATGAAACAGCAGGCTACAAAACCACTGCATGCTGTGATCCCAATTTTGTGTTTFT
 CTTTCTATATATGGATTAAAACAAAAATCCTAAAGGGAAATACGCCAAAATGTTGACAATGACTGTCTCC
 AGGTCAAAGGAGAGAGGTGGGATTGTGGGTGACTTTTAATGTGTATGATTGTC TGTATTTTACAGAATTT
 CTGCCATGACTGTGTATTTTGCATGACACATTTTAAAAATAATAAACACTATTTT'AGAATAACAGAAAA
 A [SEQ ID NO:1]

CCTTCCAAAGCCAGATCTT [SEQ ID NO:2]

GCCTGGGCAGGAACATATA [SEQ ID NO:3]

CCTGGGCAGGAACATATAT [SEQ ID NO:4]

GGTTCATTATGGCTGTGTT [SEQ ID NO:5]

Figura 11

GCTGTAGCTGGTGAGAGGAAGTCC'TAGAGGC'TATGGACACT'GCTGCTGGGATC'ACCGAGATGAGCAGC
 AGCTGCTCAGGGCTGAGCAGGGTCC'TGGTGGCCGTGGCTACAGCCC'TGGTGTCTGCCTCCTCCCCCTGCC
 CCCAGGCC'TGGGGCCCCCAGGGTCCAGTATGGGCAGCCAGGGAGGTCCGTGAAGCTGTGTTGTCCTGG
 AGTGACTGCCGGGGACCCAGTGTCC'TGGTTC'CGGGATGGGGAGCCAAAGCTGCTCCAGGGACCTGACTCT
 GGGCTAGGGCATGAAC'TGGTCC'TGGCCCAGGCAGACAGCACTGATGAGGGCACC'TACATCTGCCAGACCC
 TGGATGGTGCAC'TTGGGGGCACAG'TGACCC'TGCAGCTGGGCTACCC'TCCAGCCC'GCCCTGTTGTCTCCTG
 CCAAGCAGCCGACTAT'GAGAAC'TTCTCTTGCAC'TTGGAGTCCCAGCCAGATCAGCGGTTT'ACCACCCGC
 TACCTCACC'TCCTACAGGAAGAAGACAGTCC'TAGGAGCTGATAGCCAGAGGAGGAGTCCA'TCCACAGGGC
 CCTGGCCATGCCACAGGATCCCC'TAGGGGC'TGCCCGCTGTGTTGTCCACGGGGCTGAGTTC'TGGAGCCA
 GT'ACCGGATTAATGTGACTGAGGTGAACCCACTGGGTGCCAGCACACGCC'TGCTGGATGTGAGCTTGCAG
 AGCATCT'TGCGCCC'TGACCCACCCCAGGGCC'TGCGGGTAGAGTCAGTACCAGGTTACCCCCGACGCC'TGC
 GAGCCAGCTGGACATACCC'TGCC'TCC'TGGCCGTGCCAGCCCCACTTCC'TGCTCAAGTTCCTGTTTGCAGTA
 CCGTCCGGCCGACATCCAGCCTGGTCCACGGTGGAGCCAGCTGGACTGGAGGAGGTGATCACAGATGCT
 GTGGCTGGGCTGCCCATGCTGTACGAGTCAGTGC'CCCGGGACTTTC'TAGATGCTGGCACCTGGAGCACCT
 GGAGCCCGGAGGCC'TGGGGAAC'TCCGAGCAC'TGGAGCATACCAAGGAGA'ACCAGCATGGGGCCAGCT
 ACACACGCAGCCAGAGGTGGAGCCTCAGGTGGACAGCCC'TGCTCC'TCCAAGGCCCTCCC'TCCAACCACAC
 CCTCGGCTACTT'GATCACAGGGACTCTGTGGAGCAGGTAGCTGTGCTGGGGTCTTGGGAATCCCTTCTT
 TCCTGGGACTGGTGGCTGGGGCCCC'TGGCAC'TGGGCTCTGGCTGAGGCTGAGACGGGGTGGGAAGGATGG
 ATCCCCAAAGCCTGGGTCT'TGGCCTCAGTGA'TCCAGTGGACAGGCGTCCAGGAGCTCCAAACCTGTAG
 AGGACCAGGAGGGCTTCGGCAGATCCACCTATAATTC'TGCTTGC'TGGTGTGGATAGAAACCAGCCAG
 GACAGTAGATCCC'ATGGT'TGGATCTCAGCTGGAAGTTC'TGTTTGGAGCCAT'TTCTGTGAGACCCTGTA
 TTTCAAATTTGCAGCTGAAAGGTGCTTG'TACCTCTGA'TTTCACCCAGAGTGGAGTTC'TGCTCAAGGAA
 CCGTGTGATA'GTGTACATCTGTGTCCATGTGTGACCA'TGTGCTG'TGAAGGCCAGGGAACATGTATTCCCT
 CTGCATGCATGTATGTAGGTGCC'TGGGAGTGTGTGTGGTCC'TTGC'TCTGGCCCT'TTCCC'TTGCAGGGTTG
 TGCAGGTGTGAATAAA [SEQ ID NO:6]

GGACCATAACCAAAGGAGAT [SEQ ID NO:7]

GCGTCTTTGGGAATCCTTT [SEQ ID NO:8]

GCAGGACAGTAGATCCCT [SEQ ID NO:9]

GCTCAAGGAACGTGTGTAA [SEQ ID NO:10]

Figura 12


 Ing. Marco Montebelli
 USBM CPI 001

Nome di gene	ID del gene/ numero di accesso	Nome di siRNA	Sequenza siRNA (5'-3')	SEQ ID NO:
IL-11	NM_000641.3	siRNA 1	CCUCCAAAAGCCAGAUUCUdTdT AAGAUUGGCUUUGGAAGGdTdT	11
IL-11	NM_000641.3	siRNA 2	GCCUGGGCAGGAACAUAUAdTdT UAUAUGUUCUCCCCAGGCdTdT	12
IL-11	NM_000641.3	siRNA 3	CCUGGGCAGGAACAUAUAdTdT AUAUAUGUUCUCCCCAGGdTdT	13
IL-11	NM_000641.3	siRNA 4	GGUUCAUUAUGGCUGUGUdTdT AACACAGCCAUAUAUAAACCdTdT	14

Figura 13

Nome di gene	ID del gene/ numero di accesso	Nome di siRNA	Sequenza siRNA (5'-3')	SEQ ID NO:
IL-11R	U32324.1	siRNA 5	GGACCAUACCAAAGGAGAUGdTdT AUCUCCUUUGGUAUGGUCCdTdT	15
IL-11R	U32324.1	siRNA 6	GCGUCUUUGGGAUCCUUUdTdT AAAGGAUUCCCAAAGACGCdTdT	16
IL-11R	U32324.1	siRNA 7	GCAGGACAGUAGAUCUUAdTdT UAGGAUCUACUGUCUGCCdTdT	17
IL-11R	U32324.1	siRNA 8	GCUCAAGGAACGUGUGUAAdTdT UUACACACGUUCCUUGAGCCdTdT	18

Figura 14

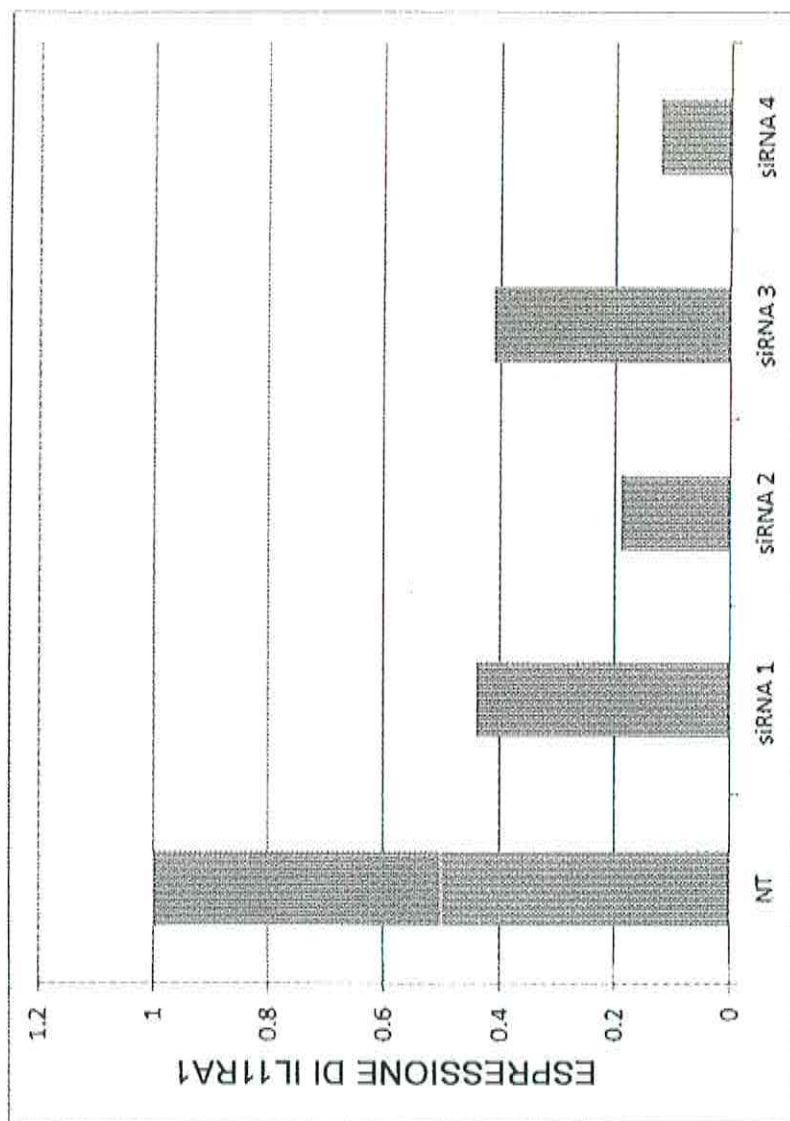


Figura 15

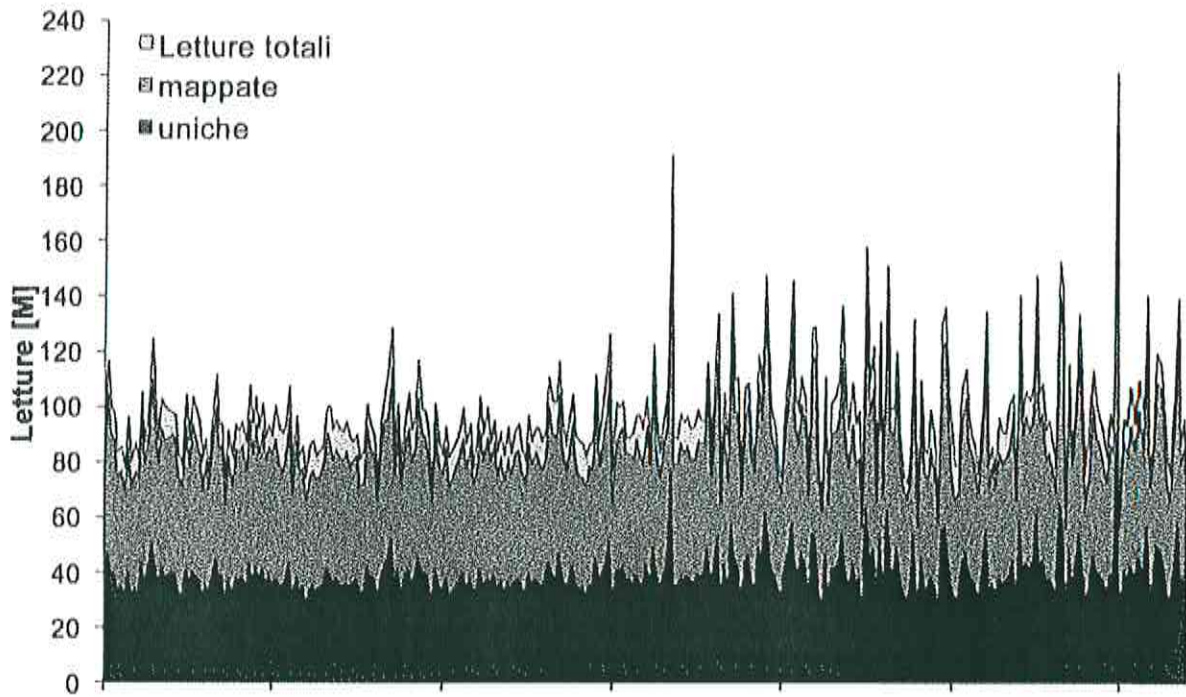


Figura 16

PECAM1 - CD31

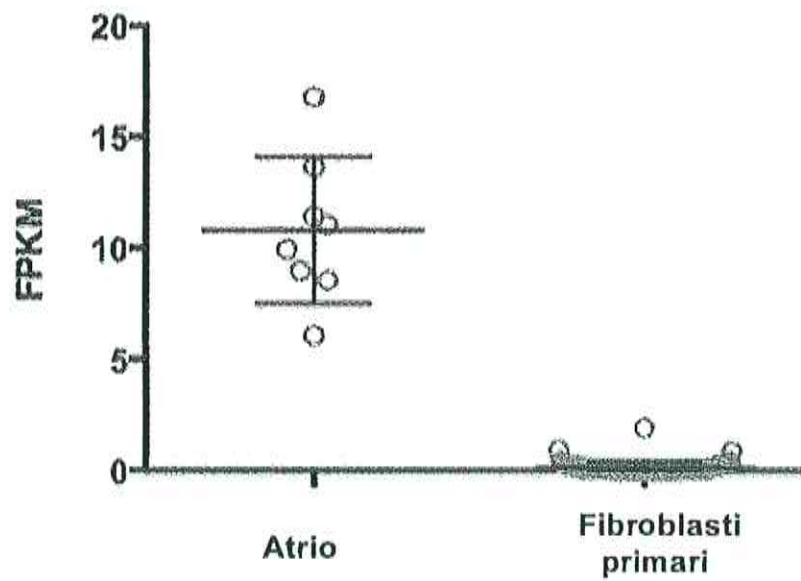


Figura 17A

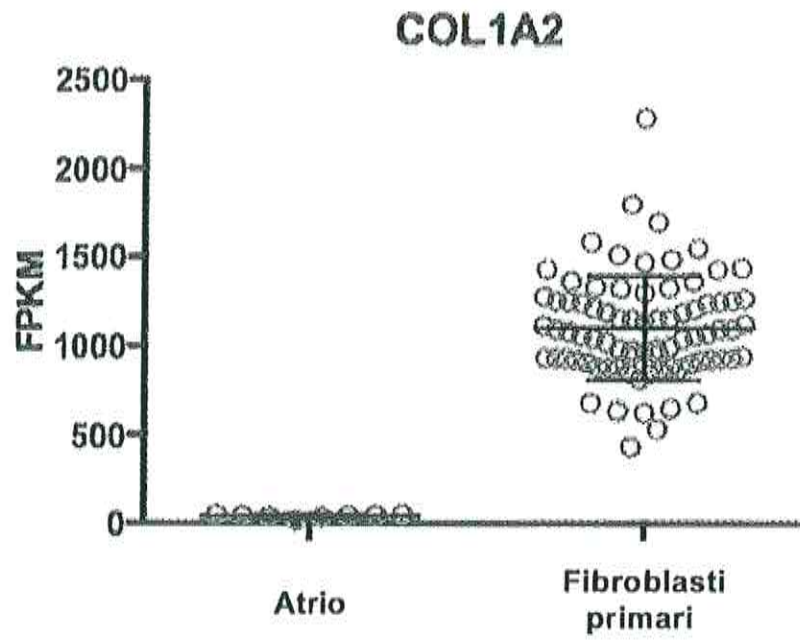


Figura 17D

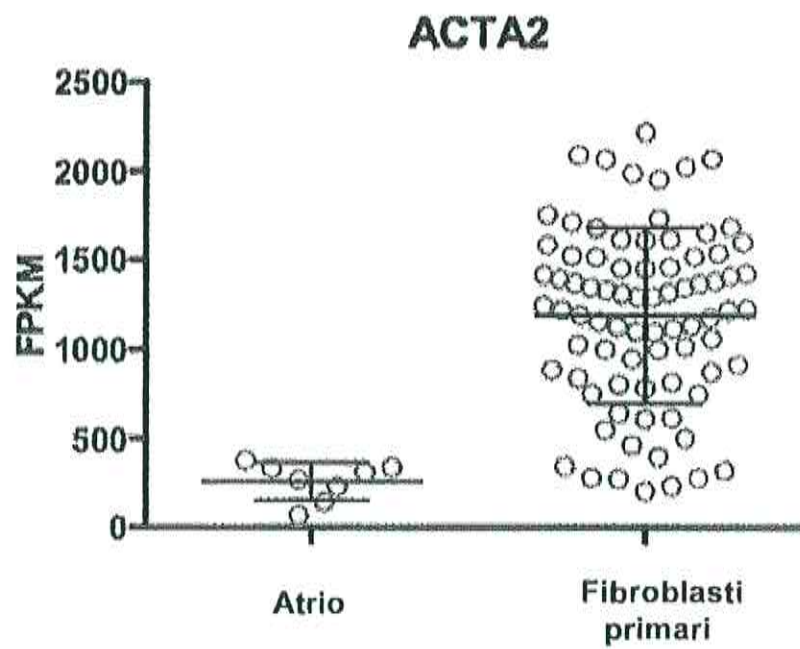


Figura 17E

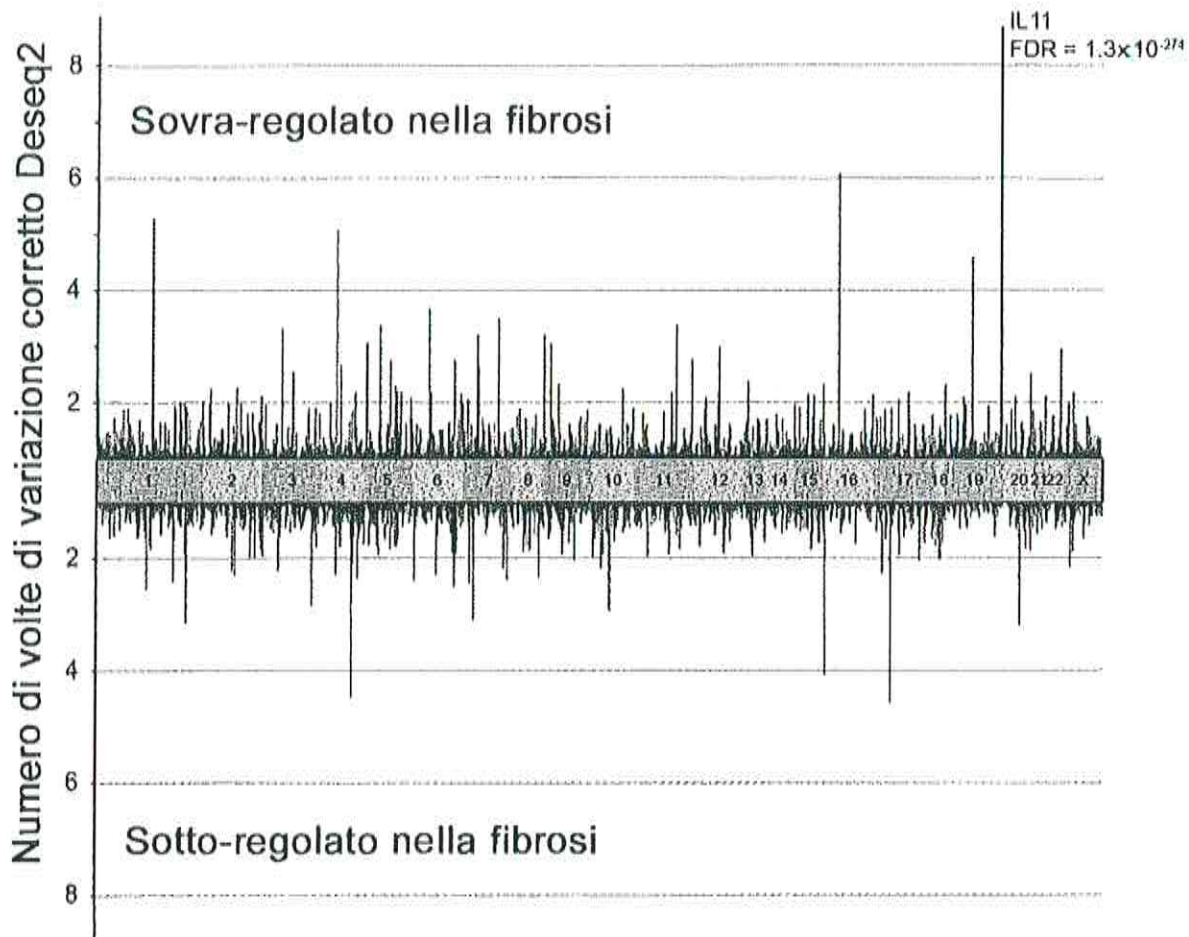


Figura 18A

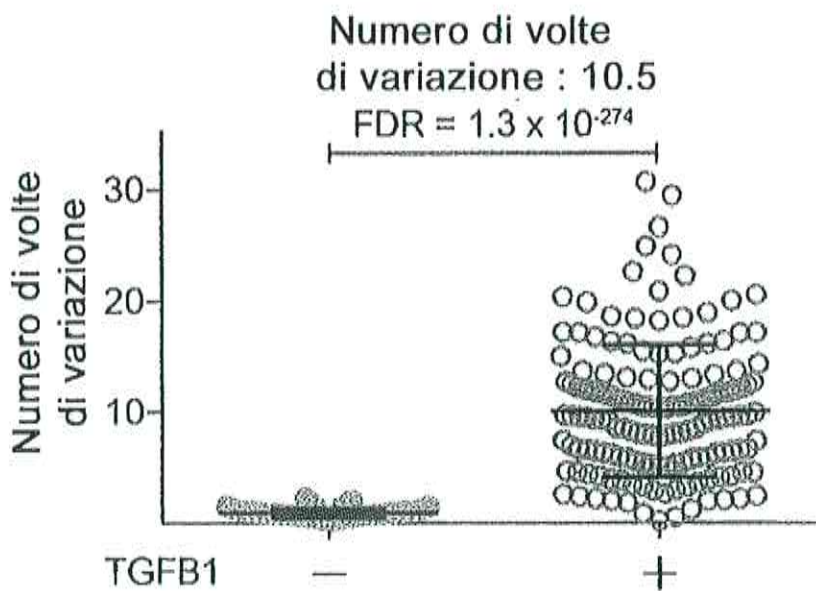


Figura 18B

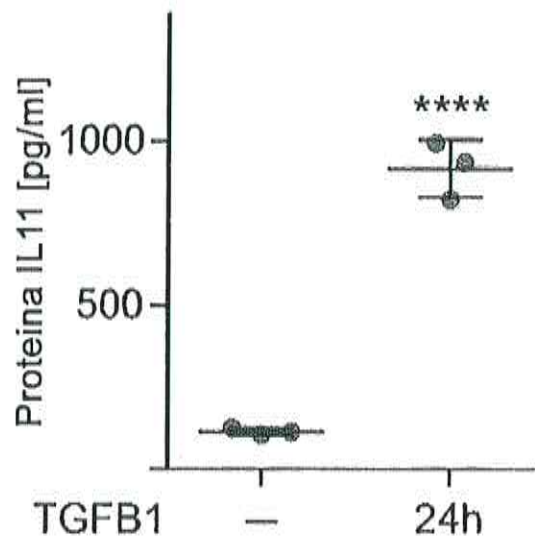


Figura 18C

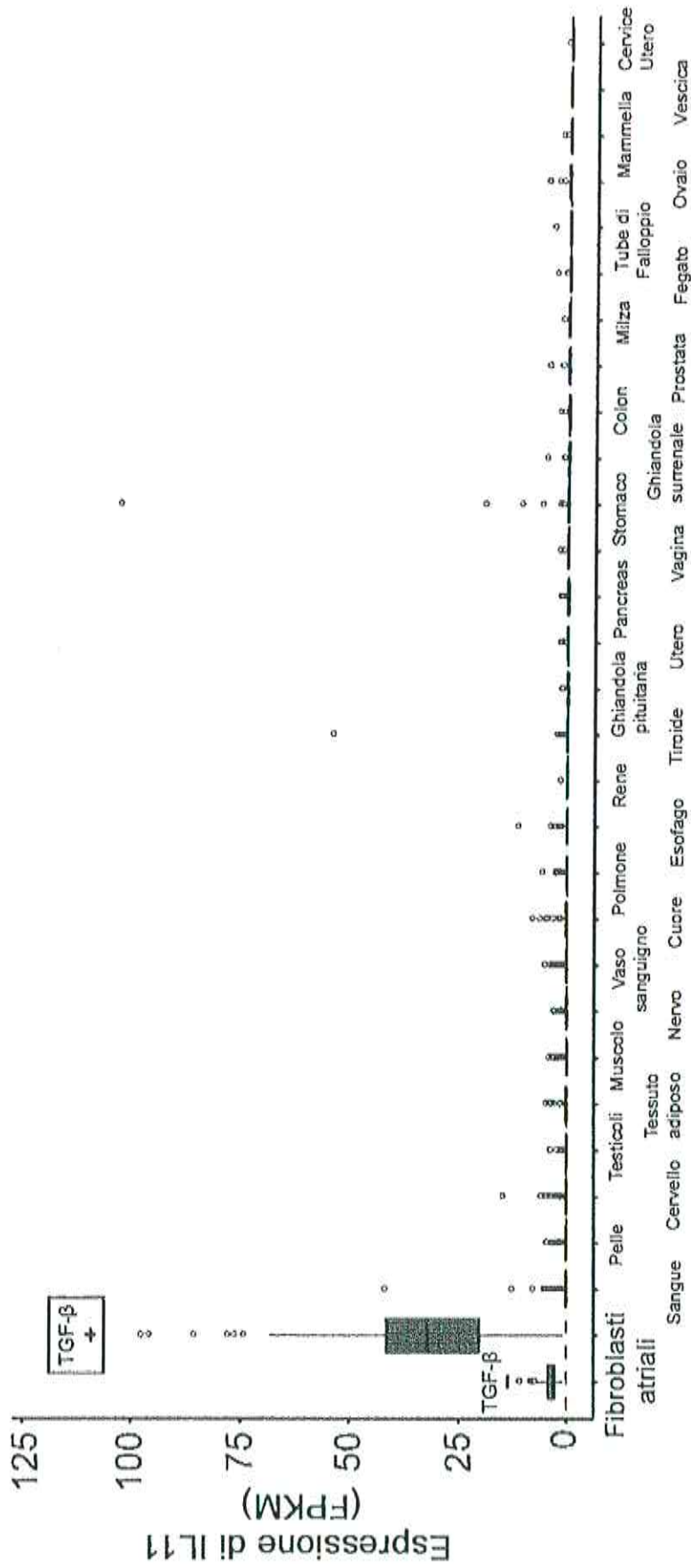


Figura 18D

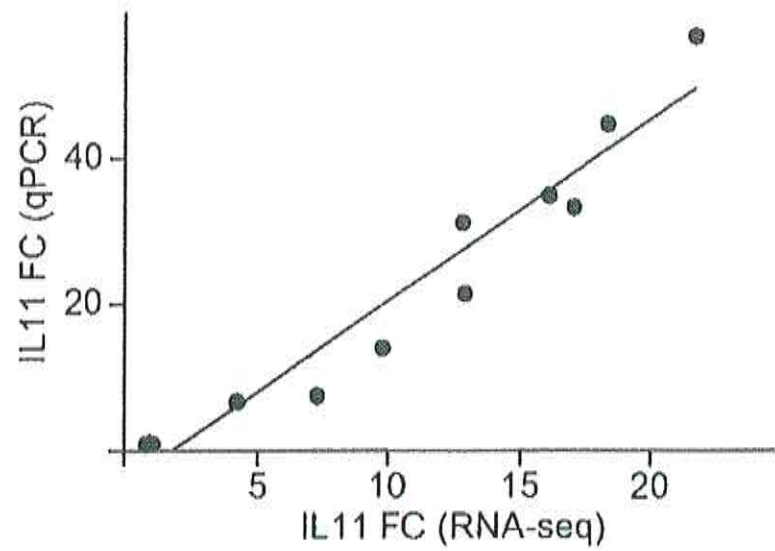


Figura 18E

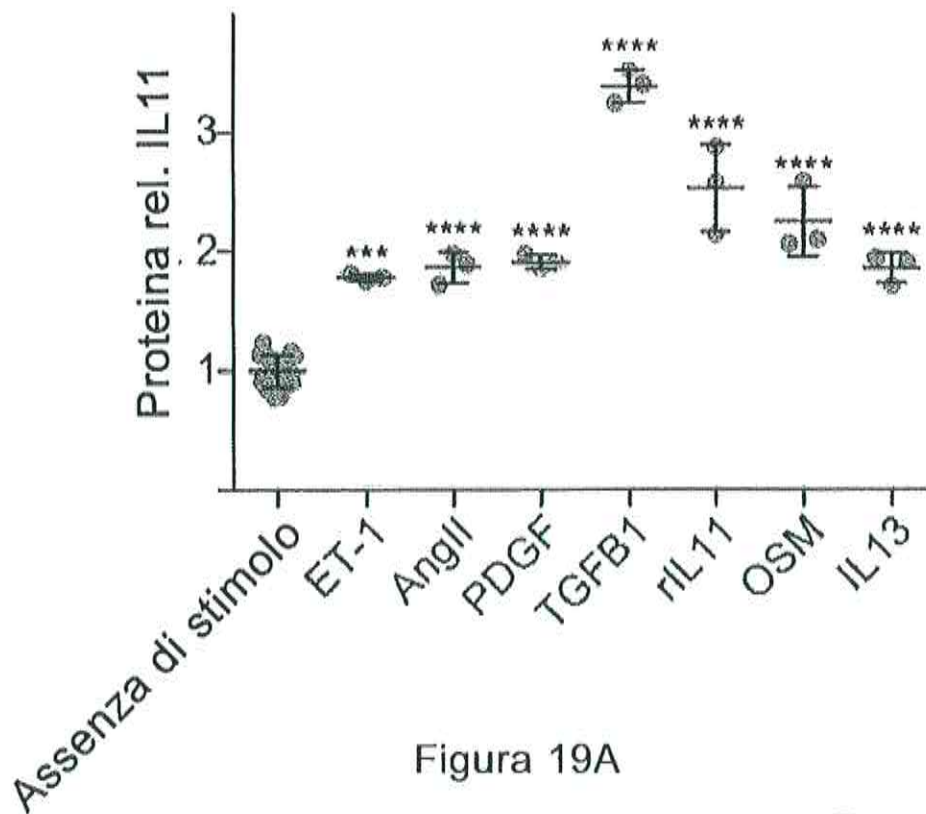


Figura 19A

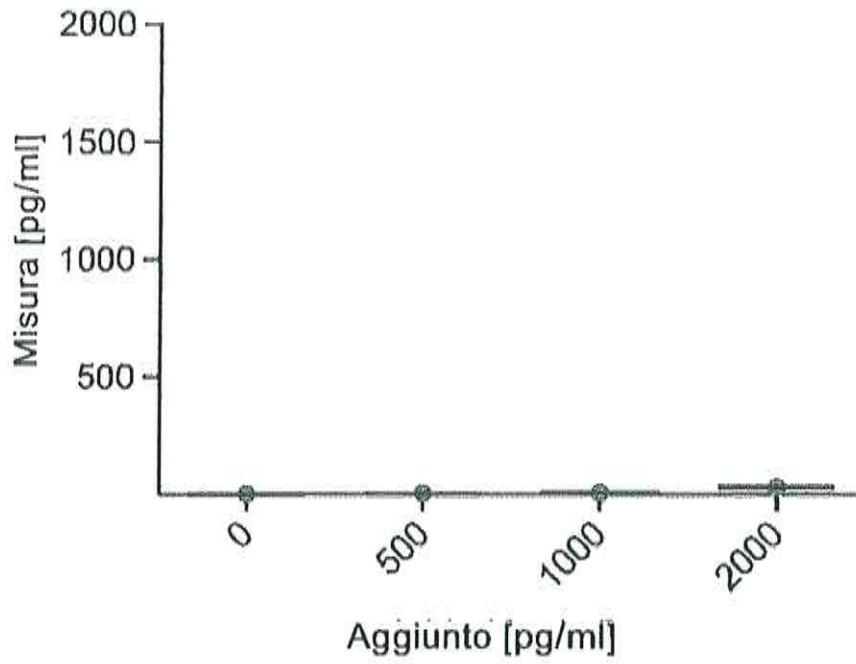


Figura 19B

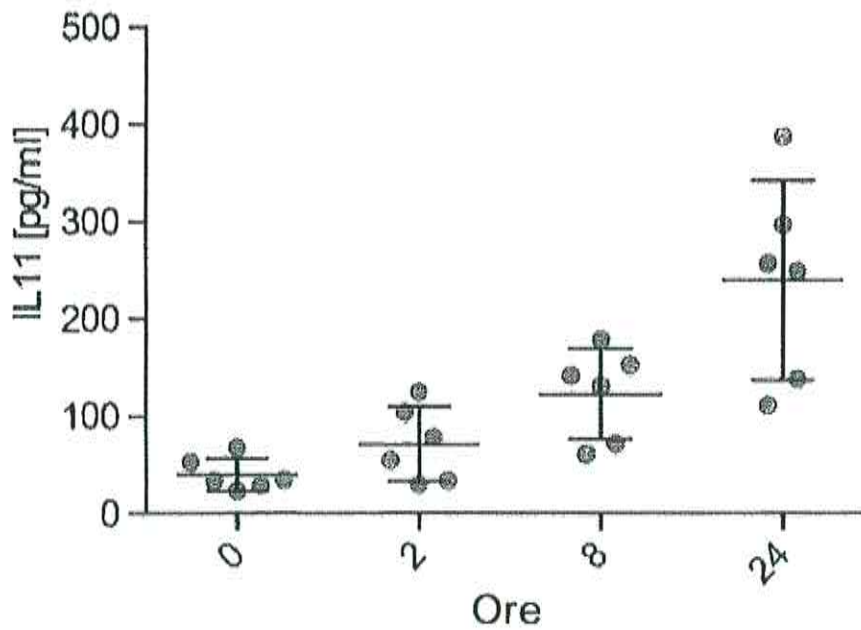


Figura 19C

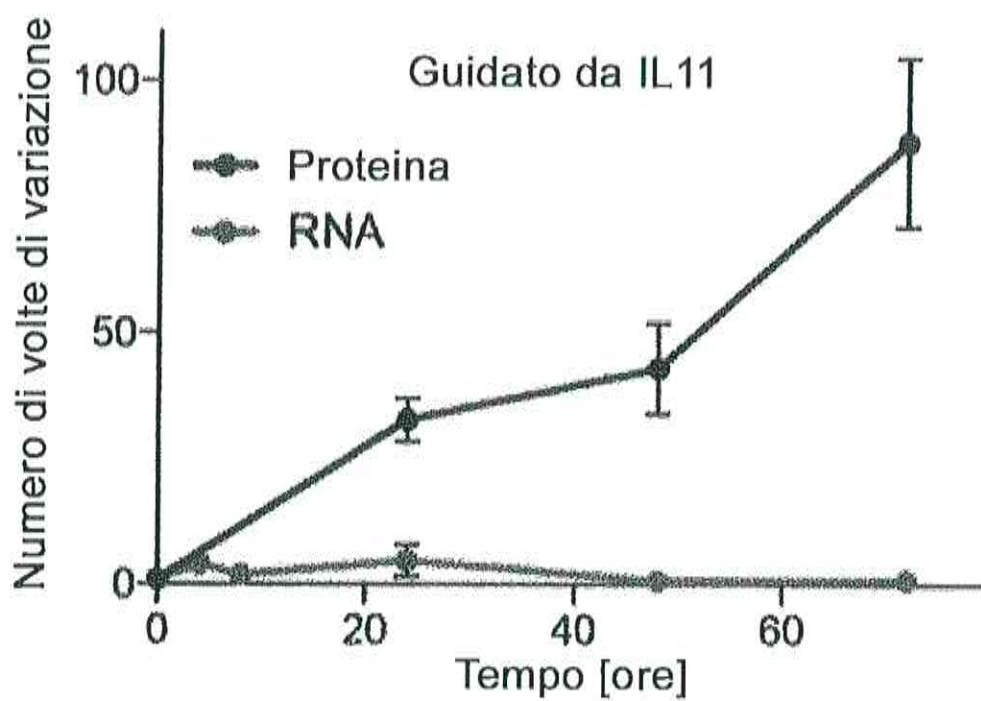


Figura 19D

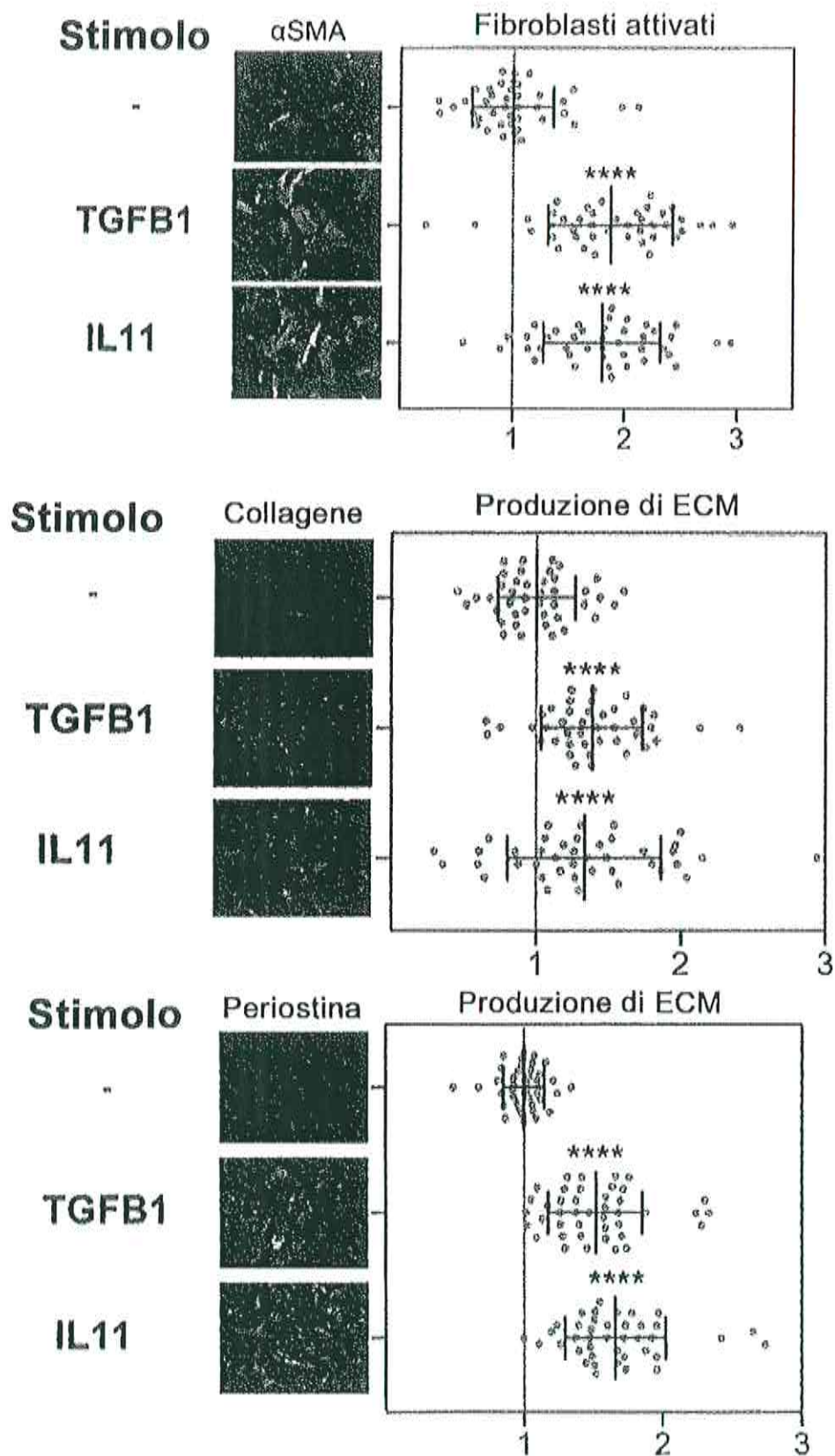


Figura 20A

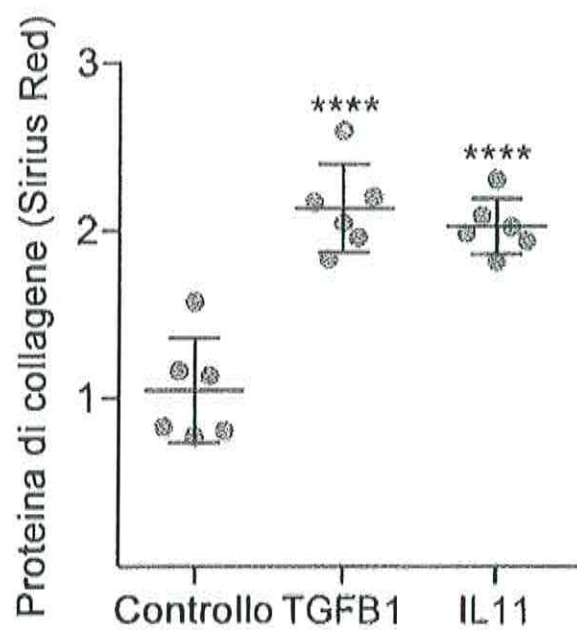


Figura 20B

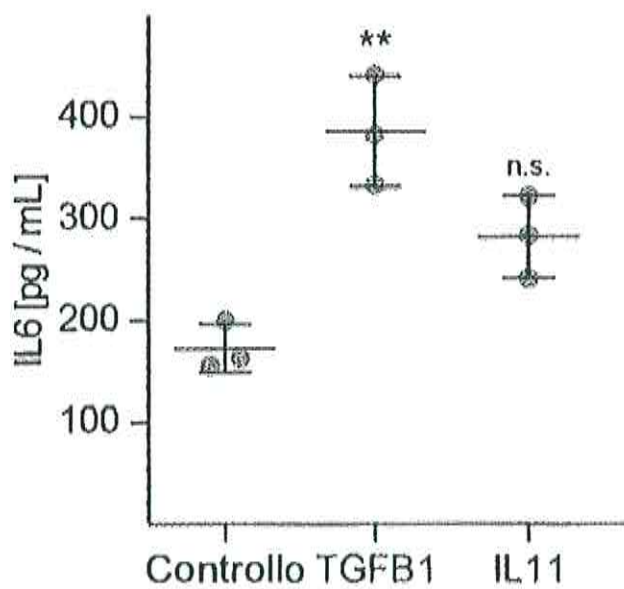


Figura 20C

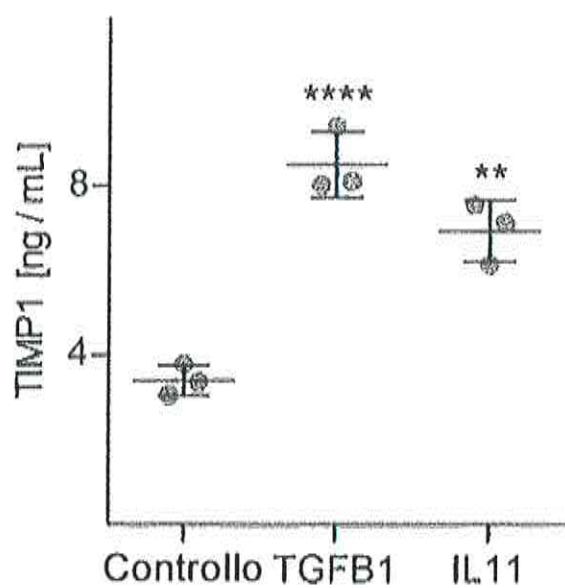


Figura 20D

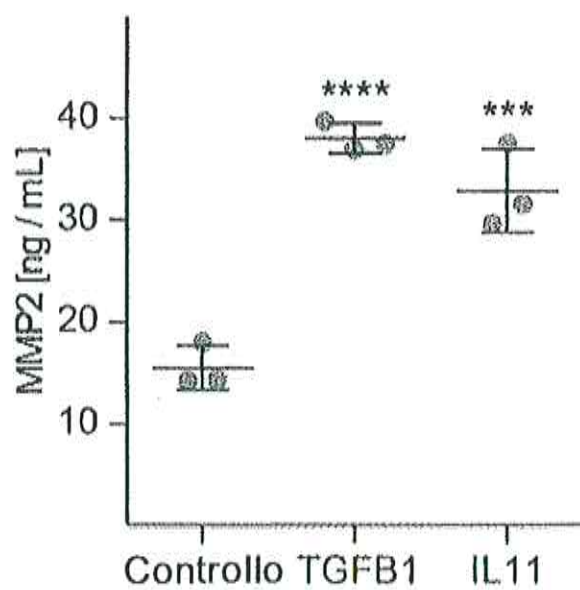


Figura 20E

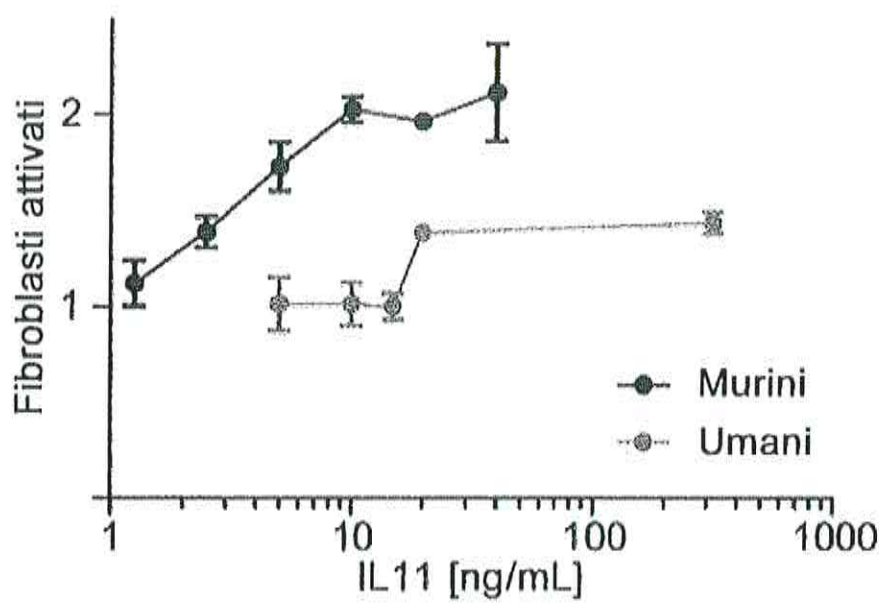


Figura 20F

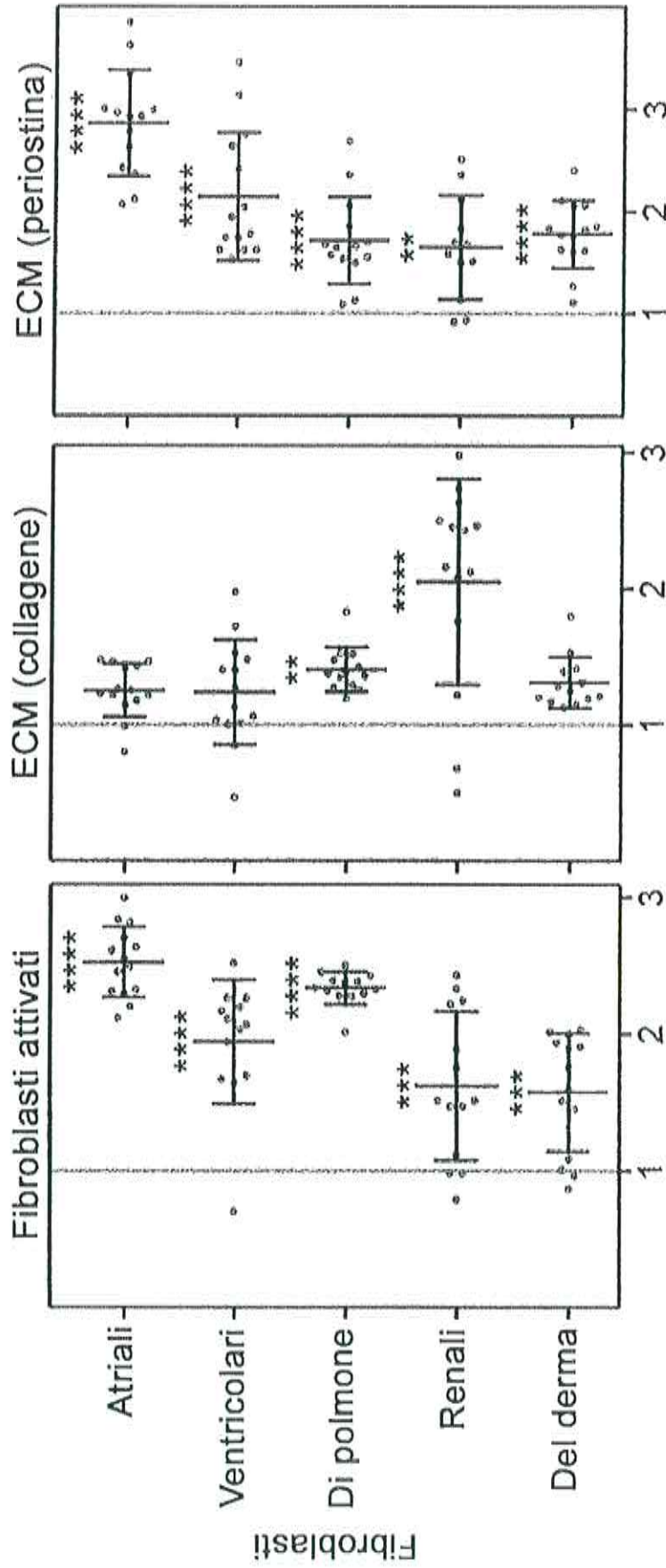


Figura 21A

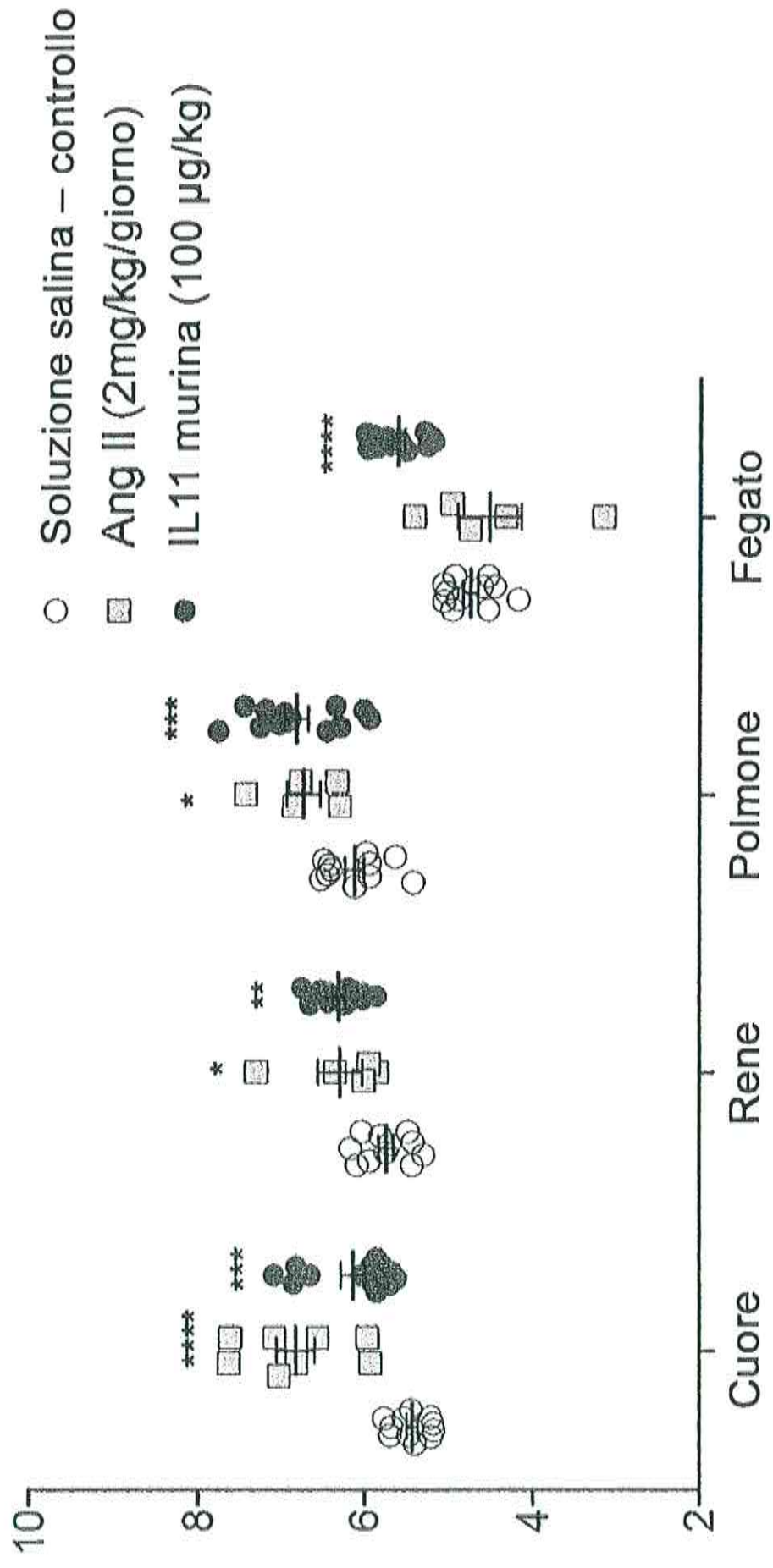


Figura 21B

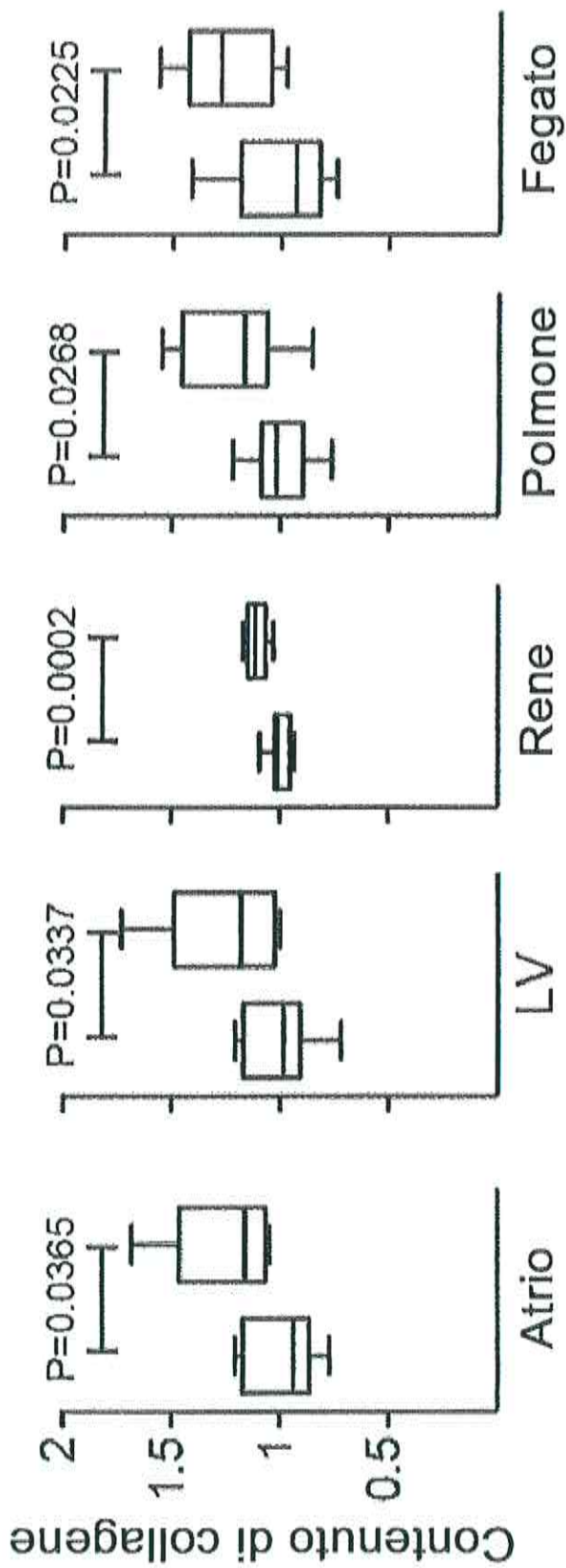


Figura 21C

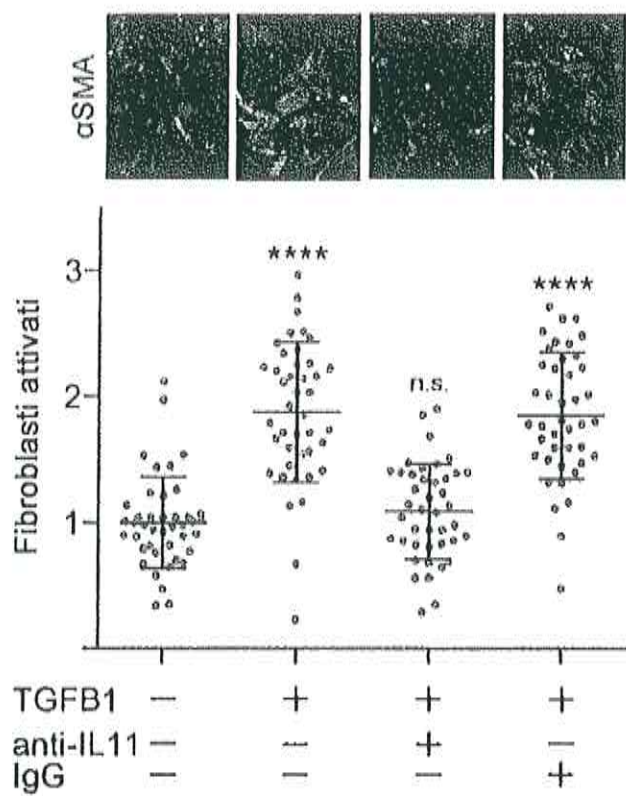


Figura 22A

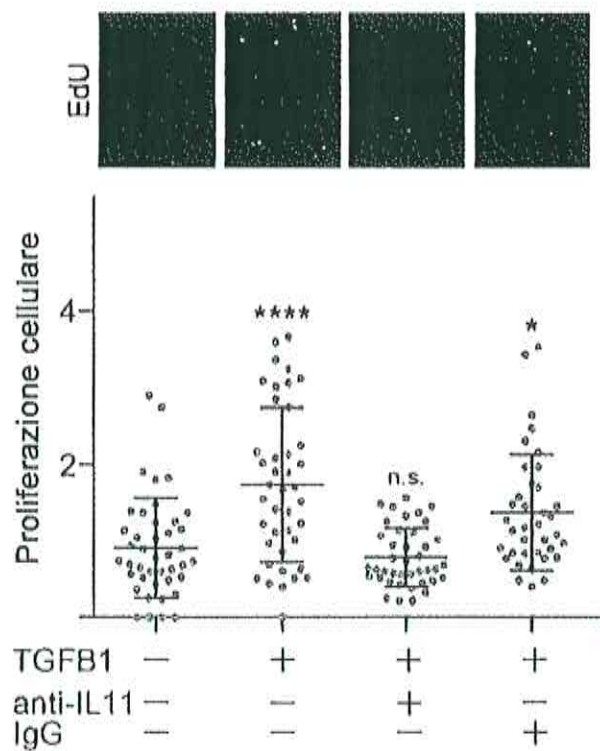


Figura 22B

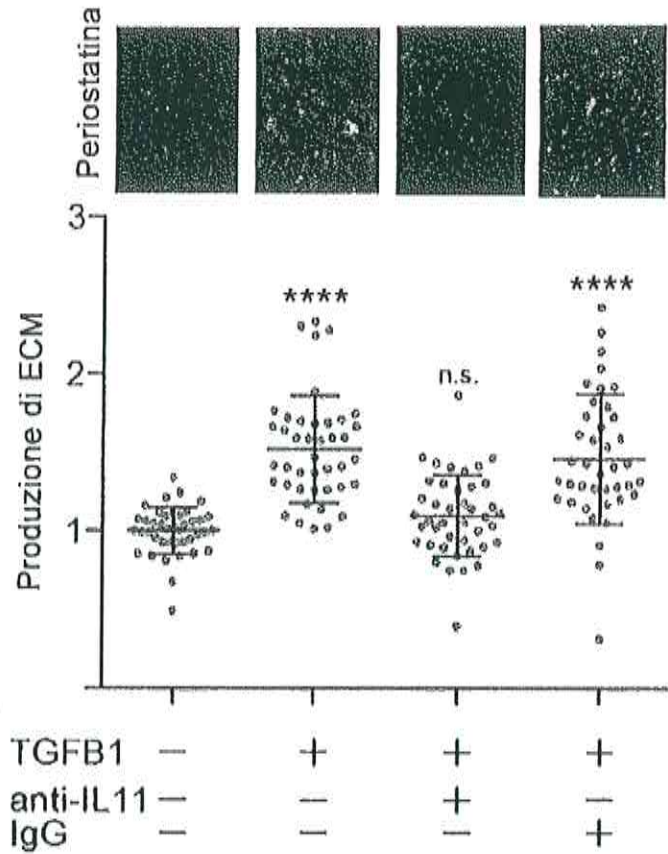


Figura 22C

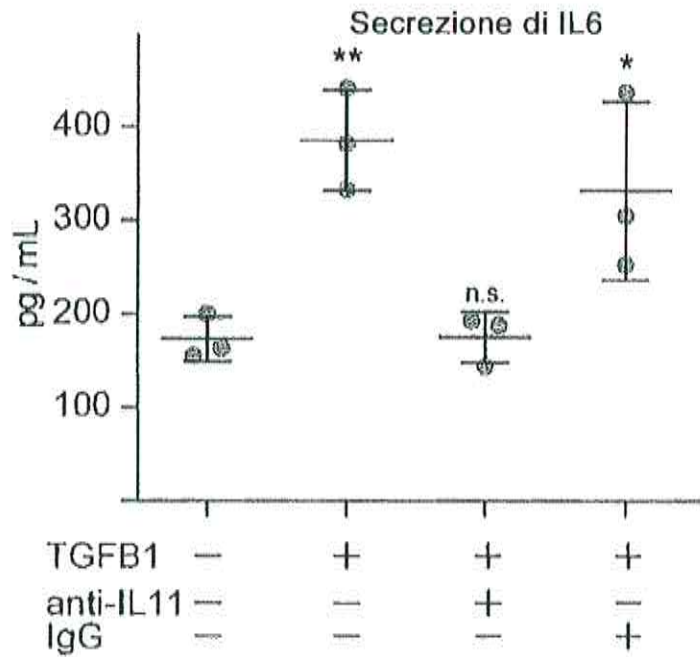


Figura 22D

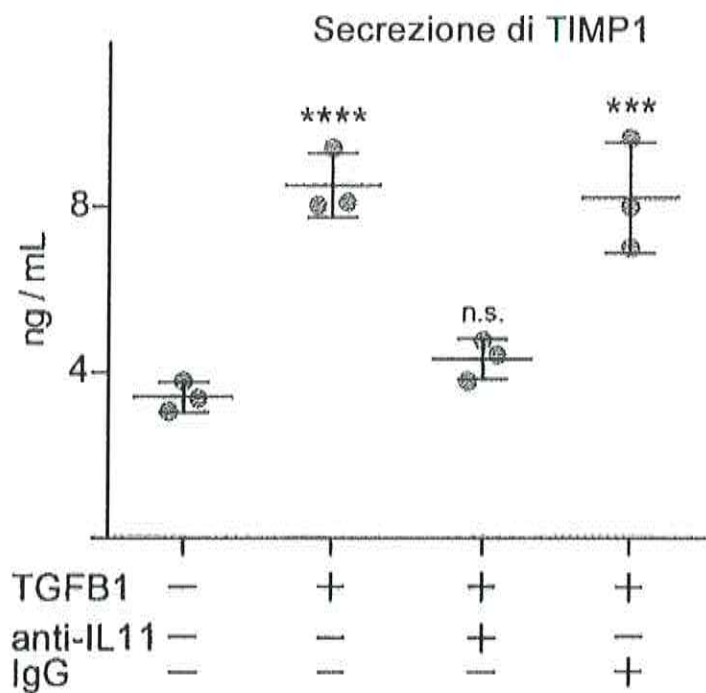


Figura 22E

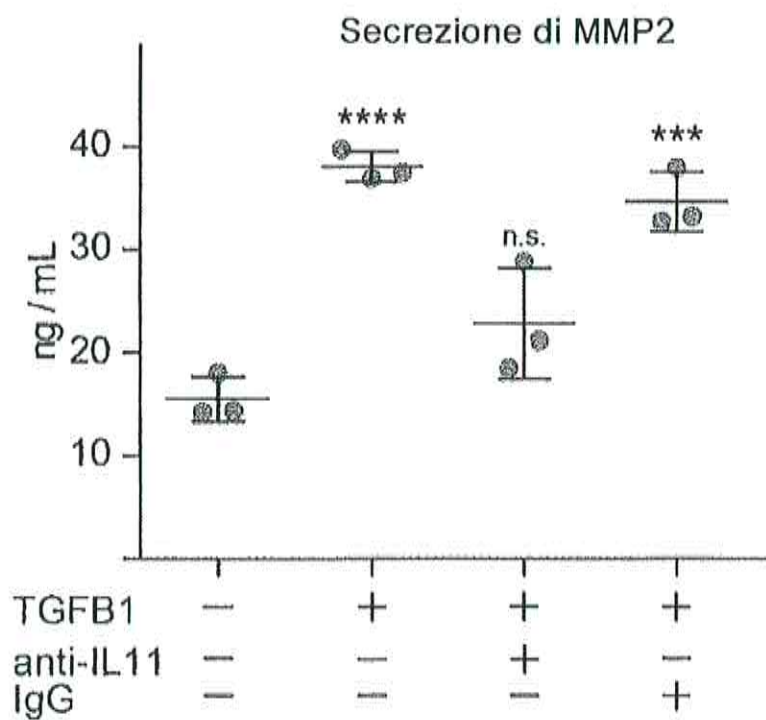


Figura 22F

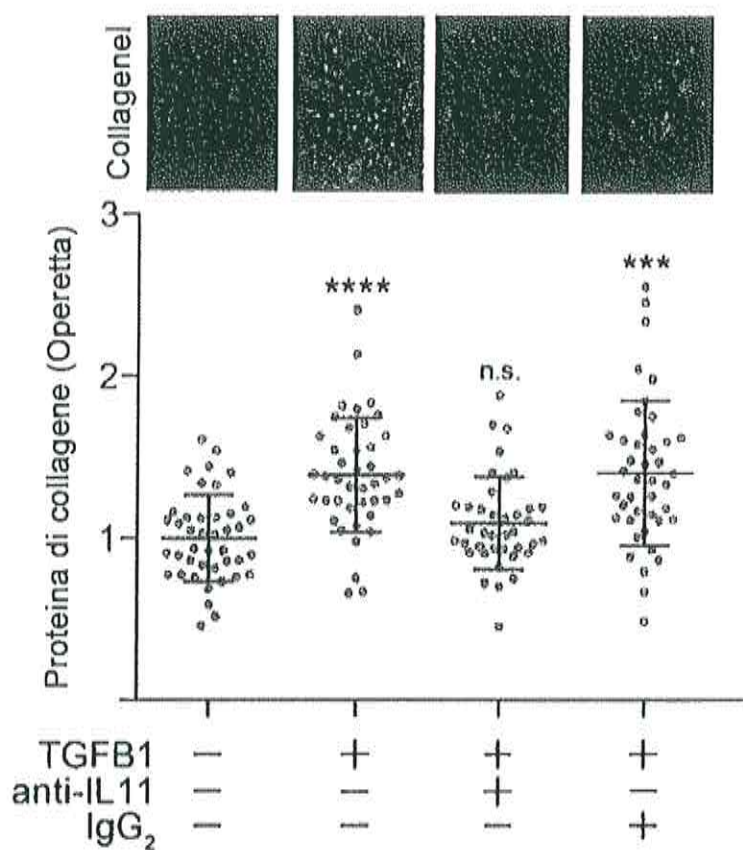


Figura 23A

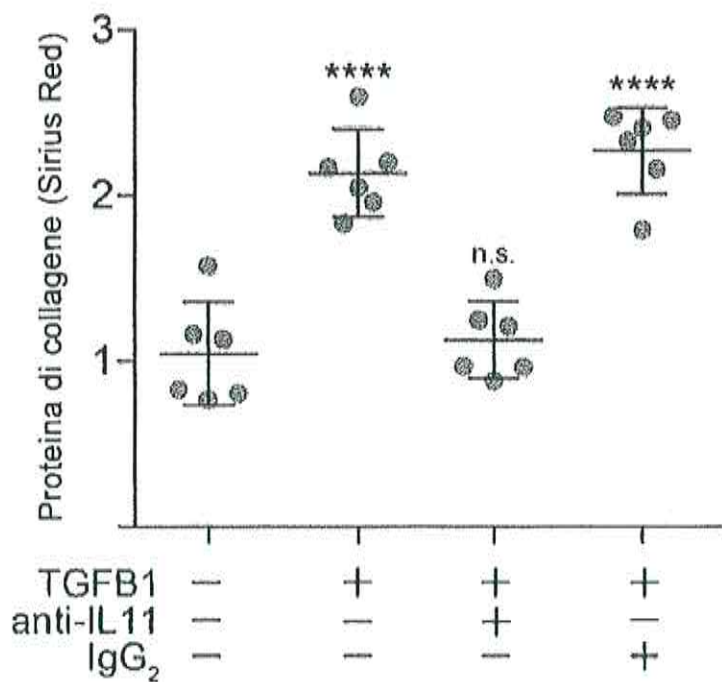


Figura 23B

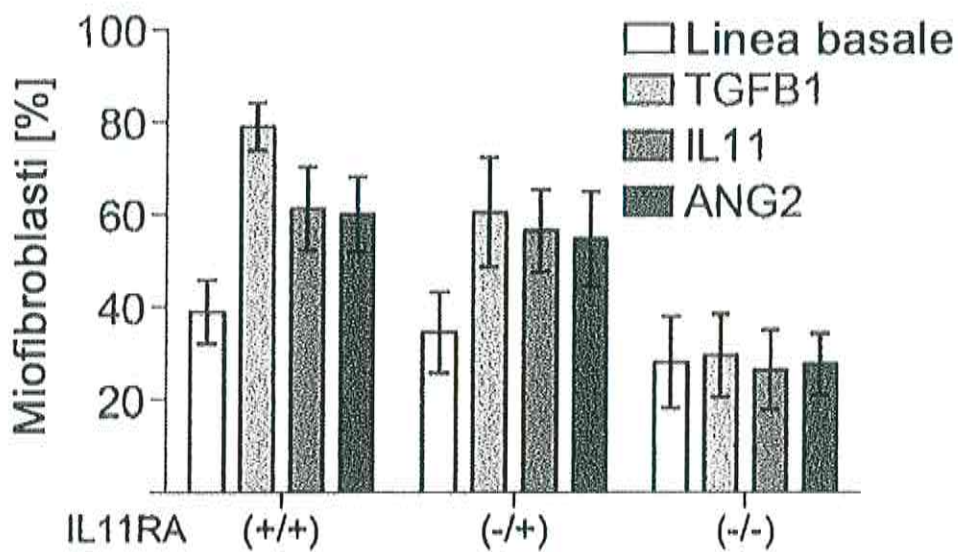


Figura 25A

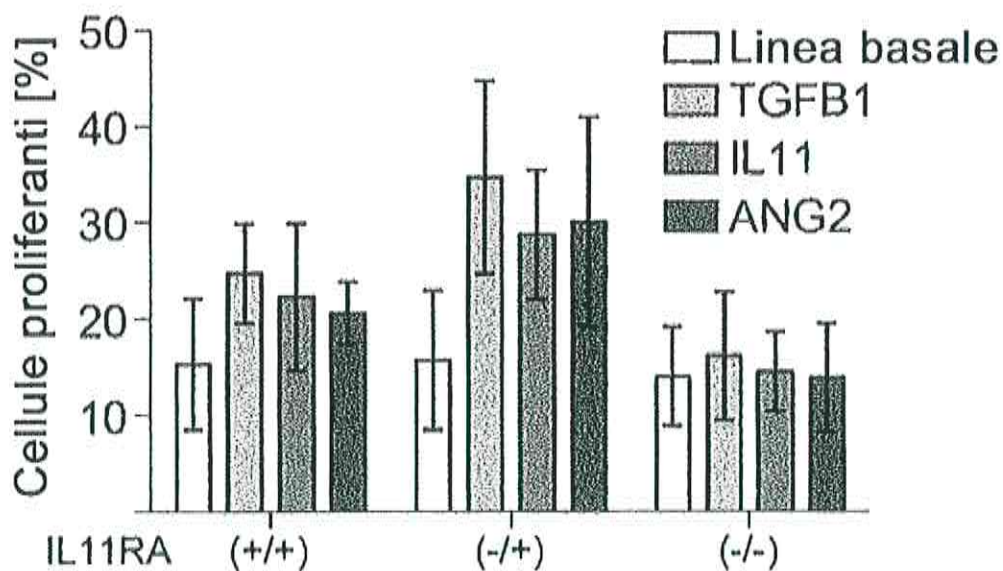


Figura 25B

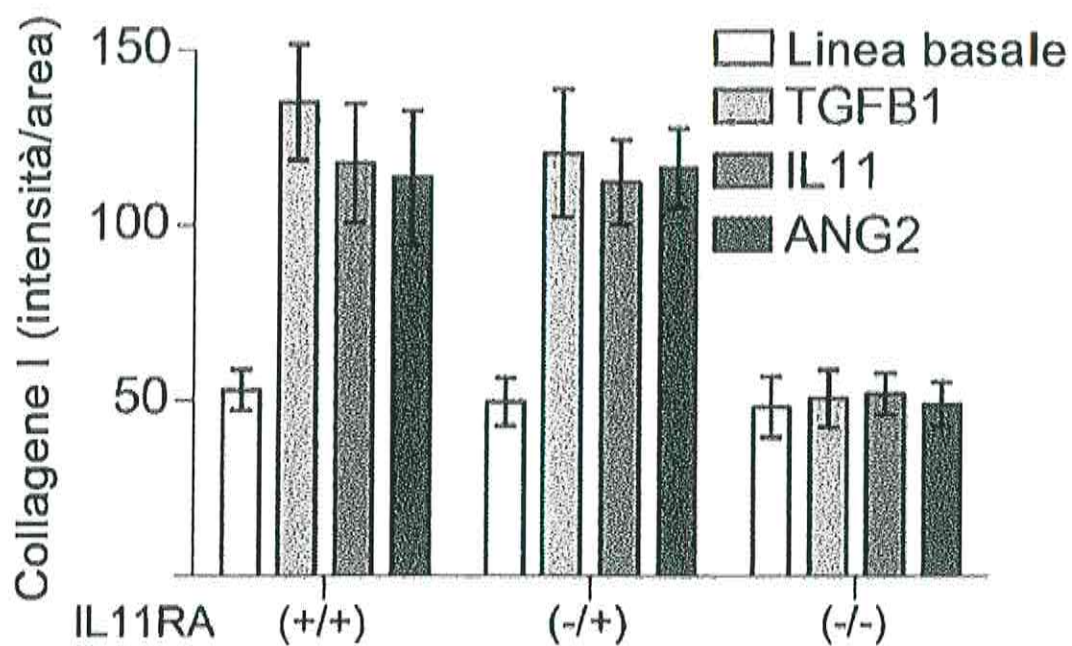


Figura 25C

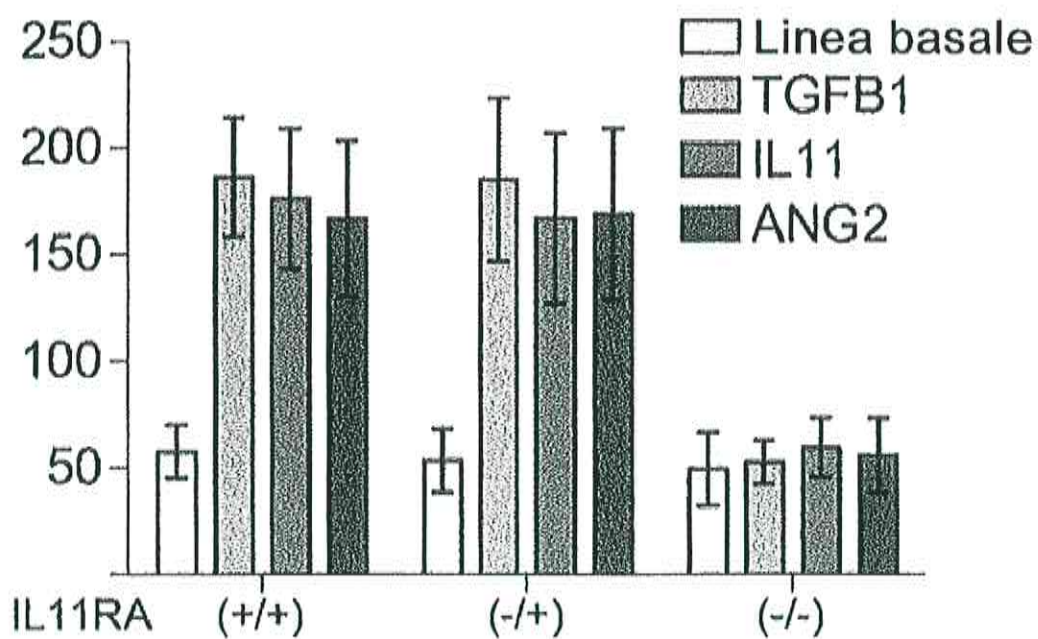


Figura 25D

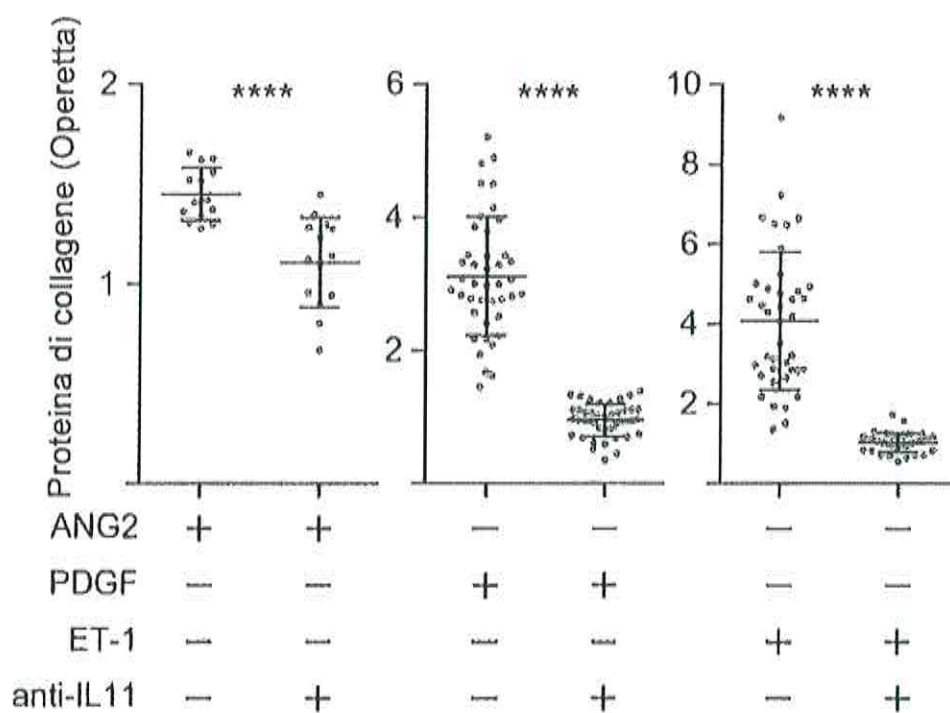


Figura 26A

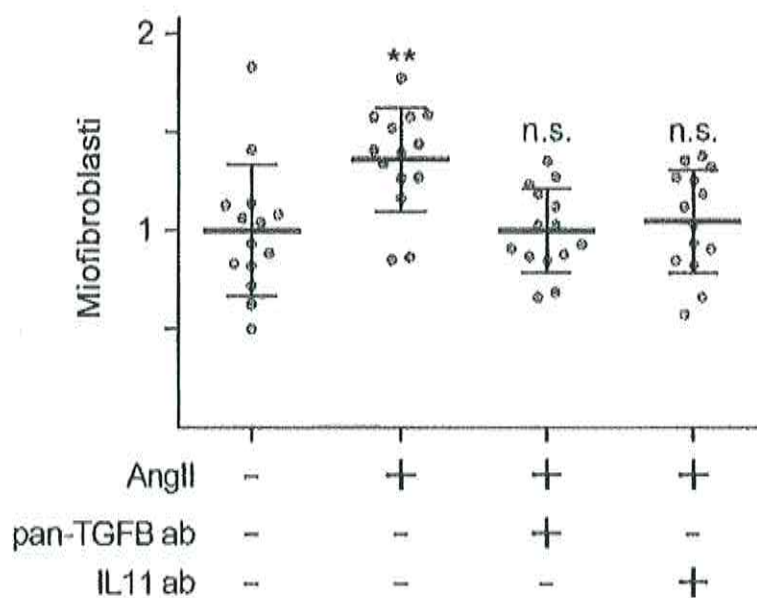
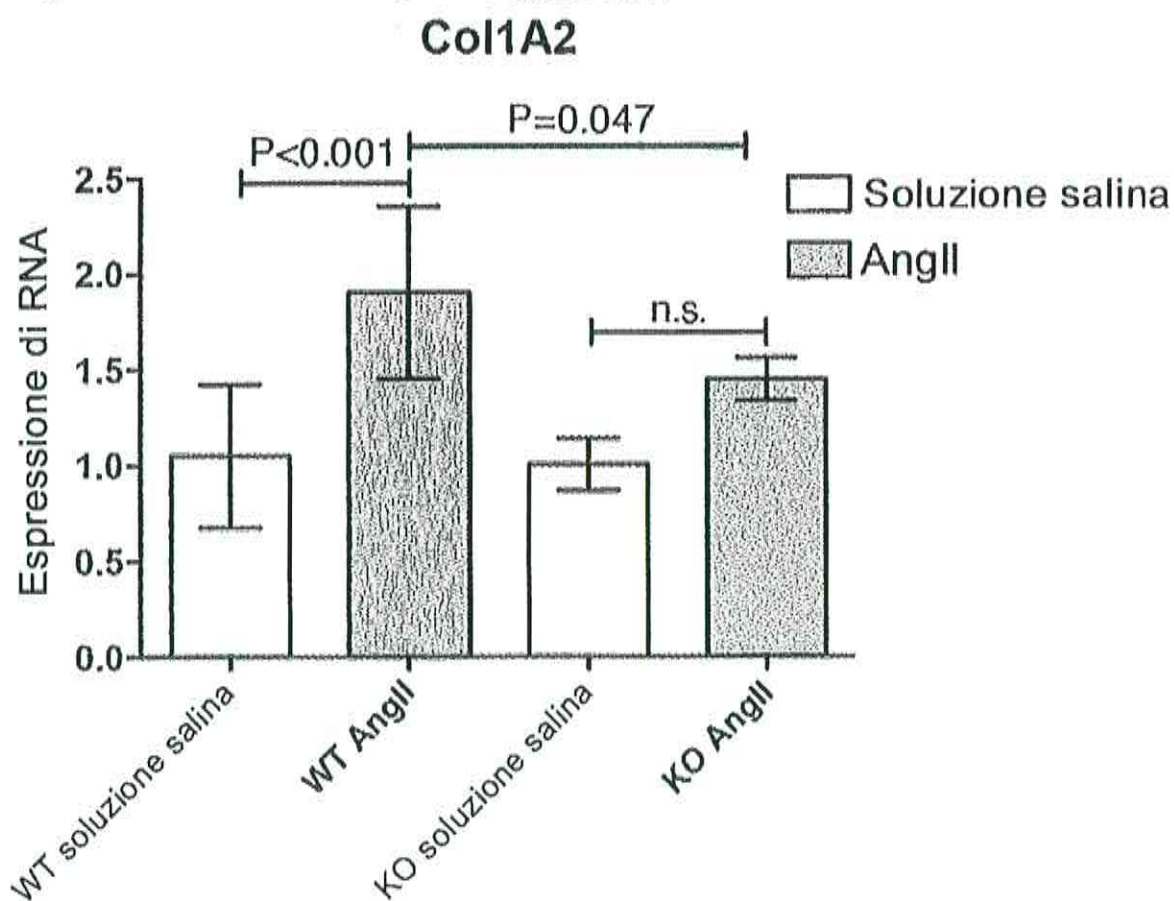
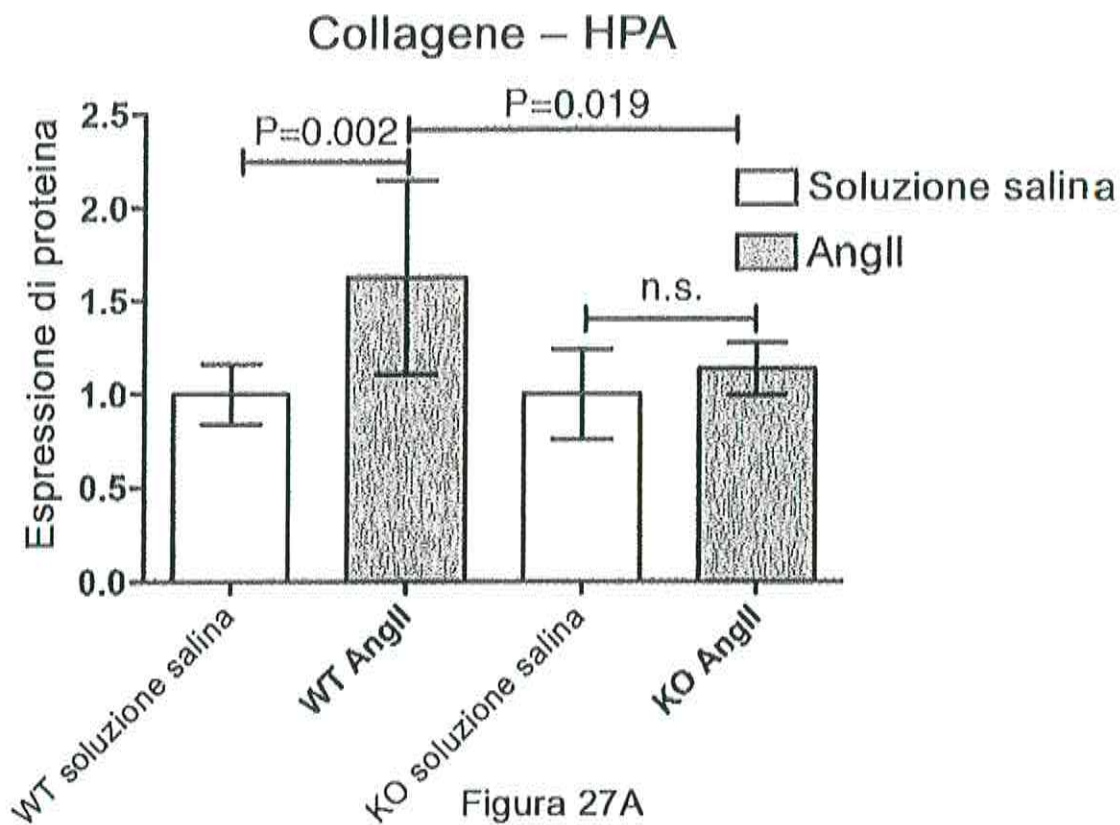


Figura 26B



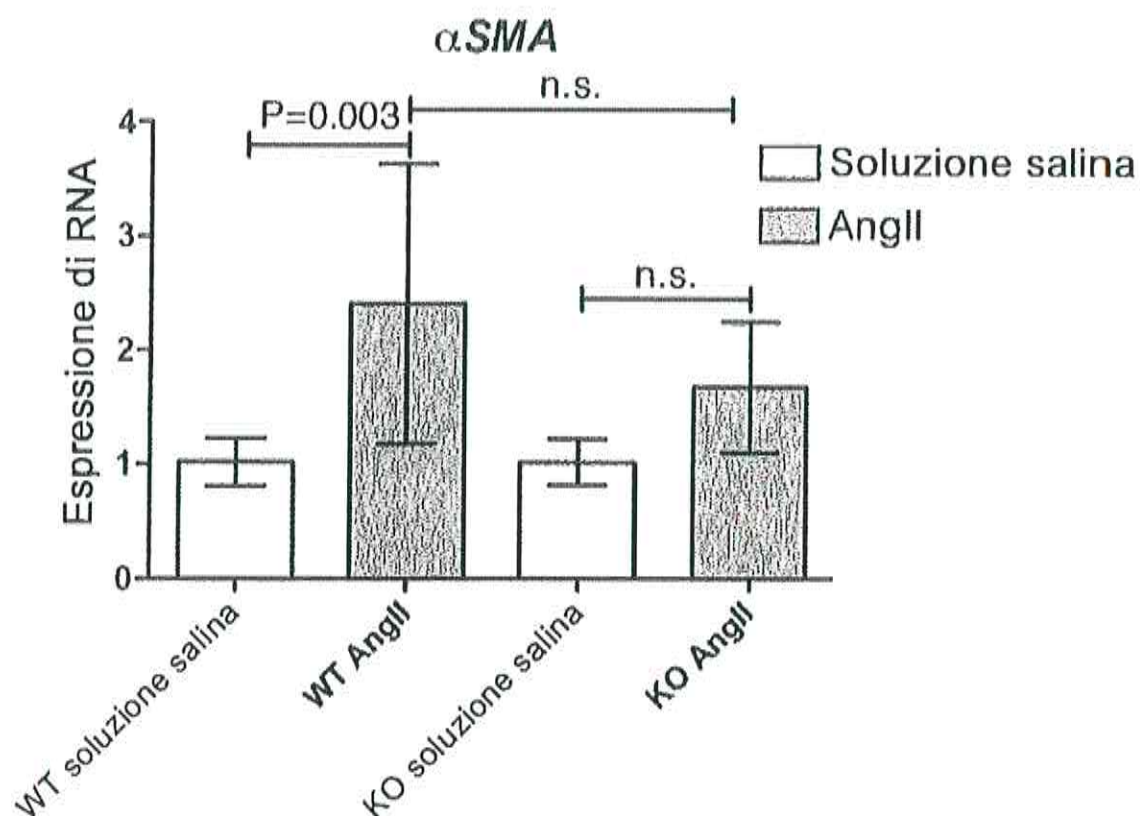


Figura 27C

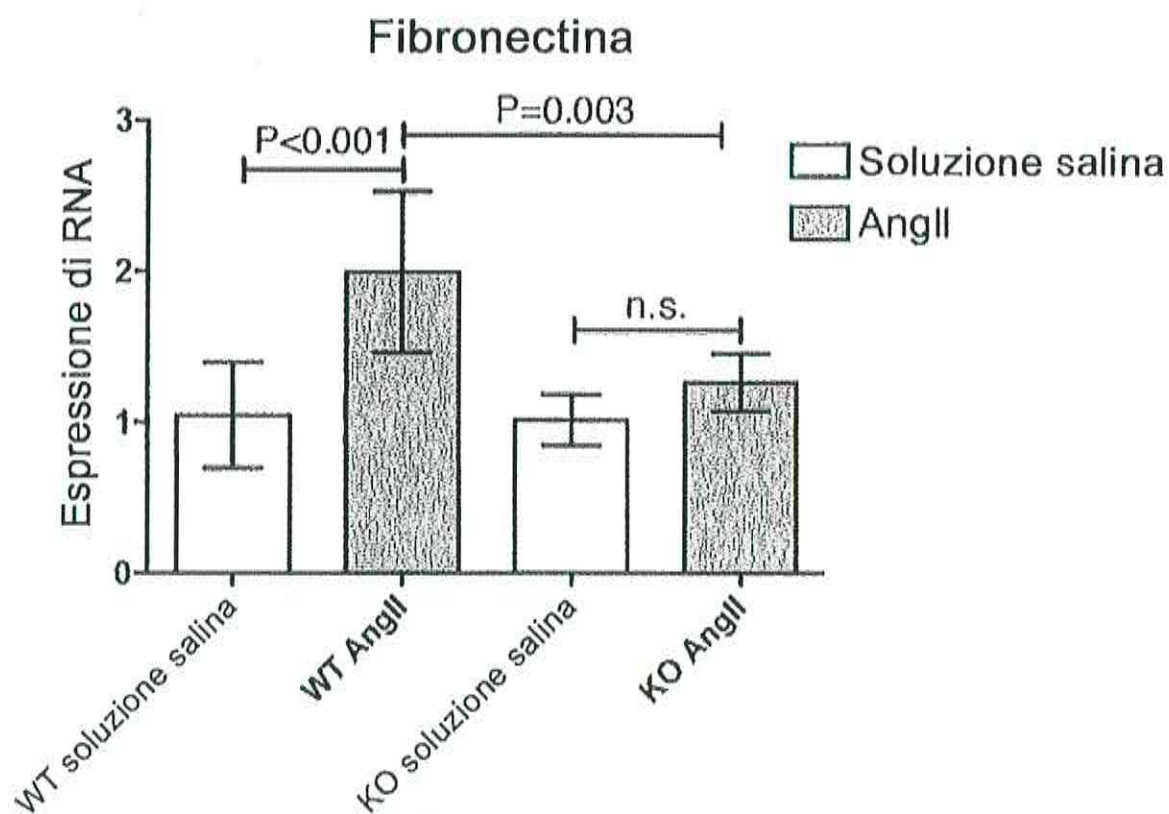


Figura 27D

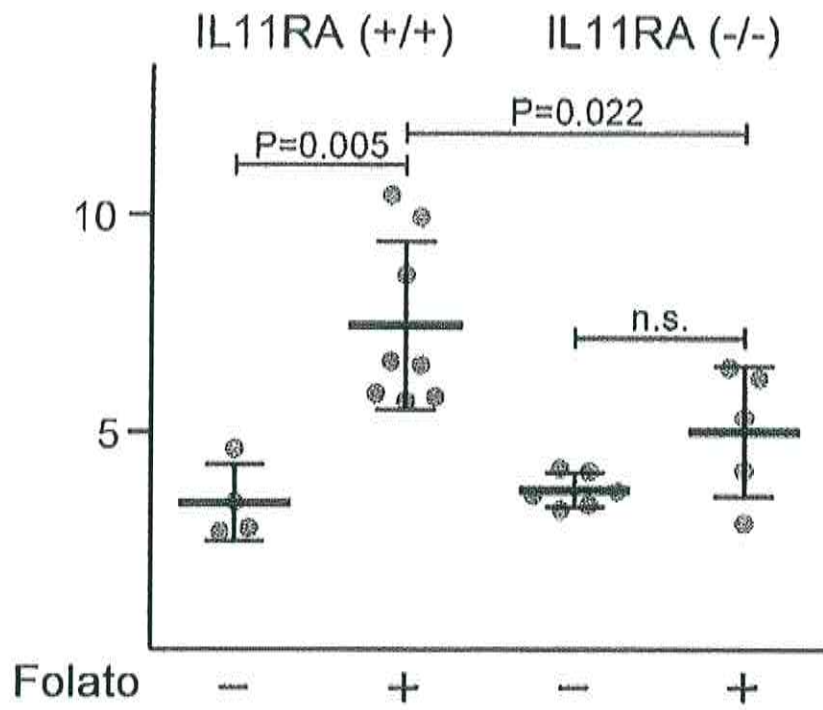


Figura 28

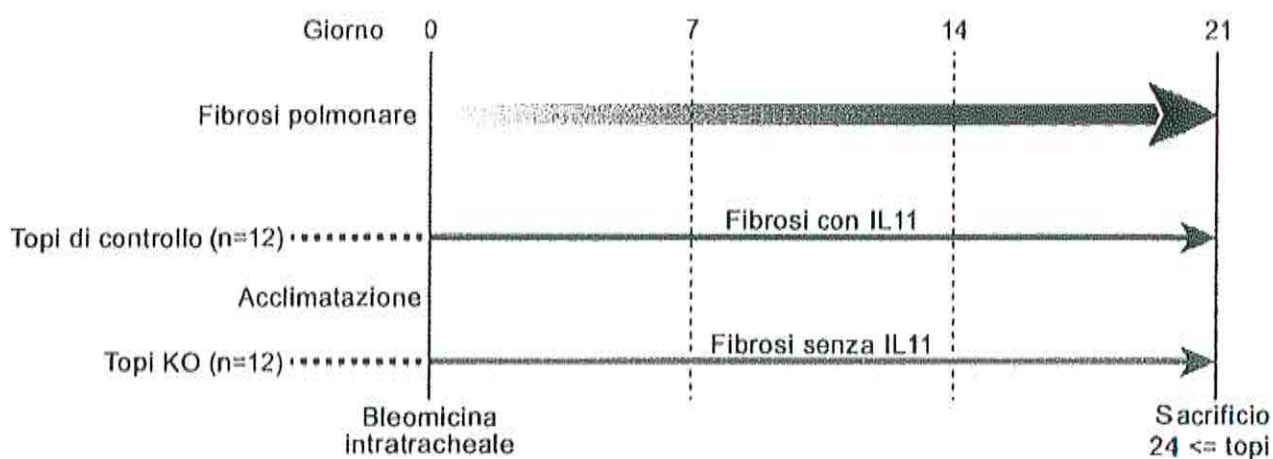


Figura 29A

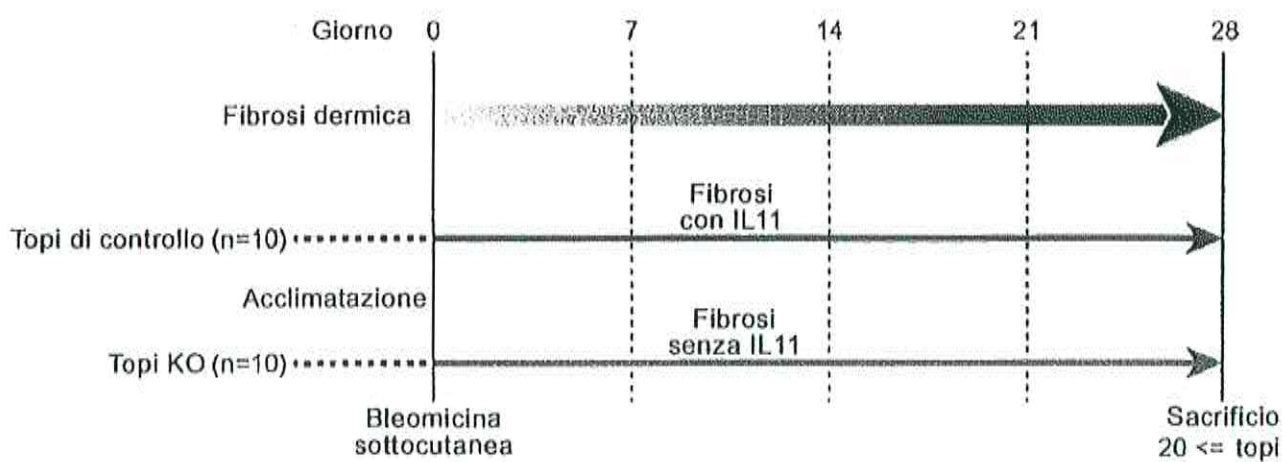


Figura 29B

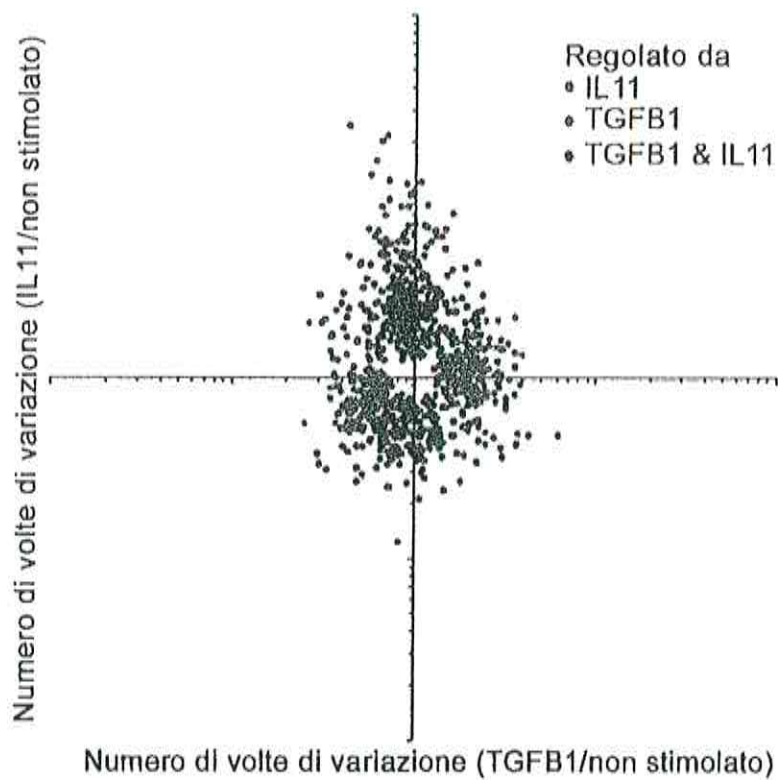


Figura 30A

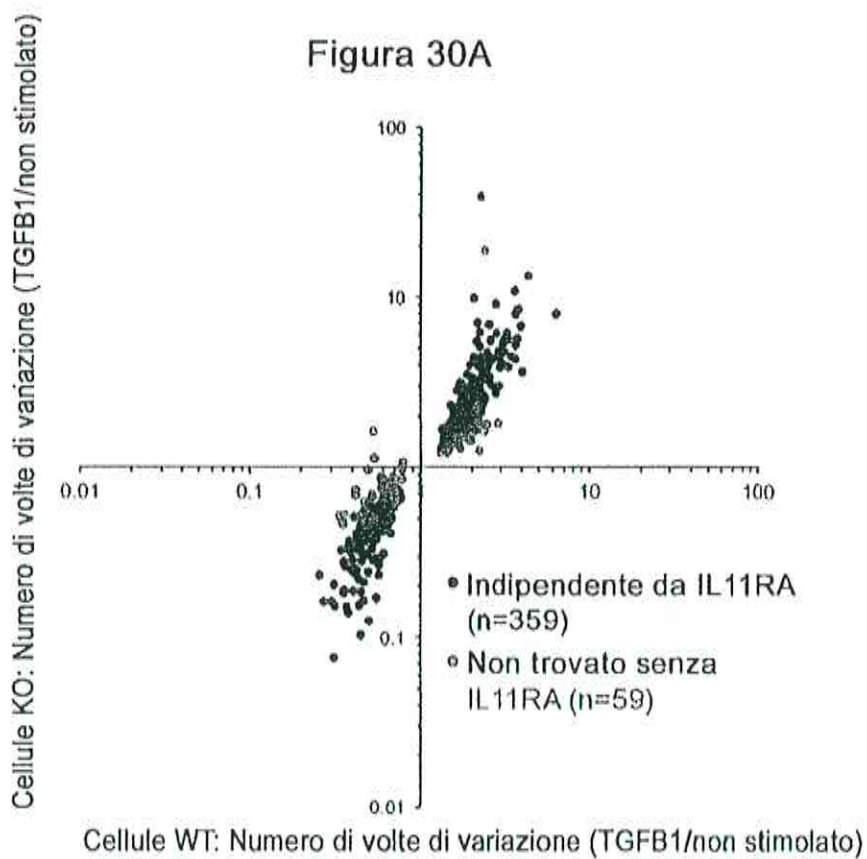


Figura 30B

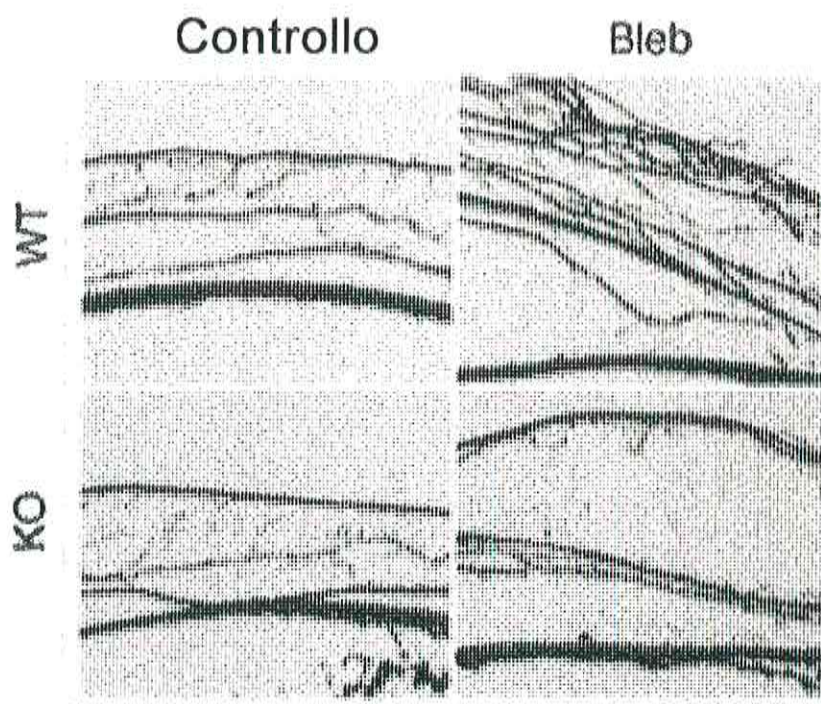


Figura 31A

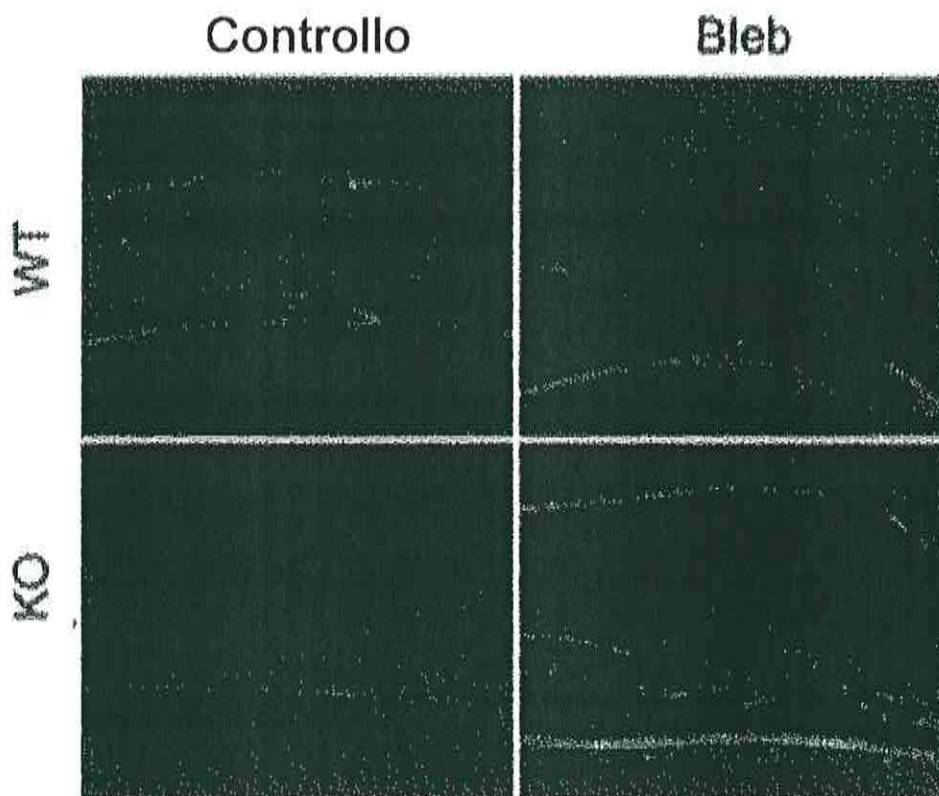


Figura 31B

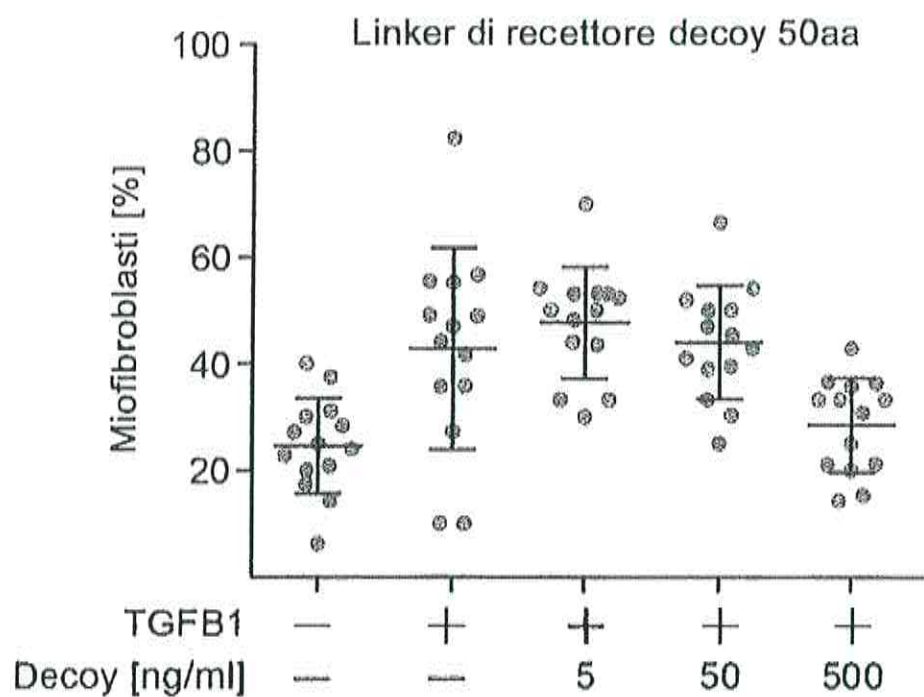


Figura 32A

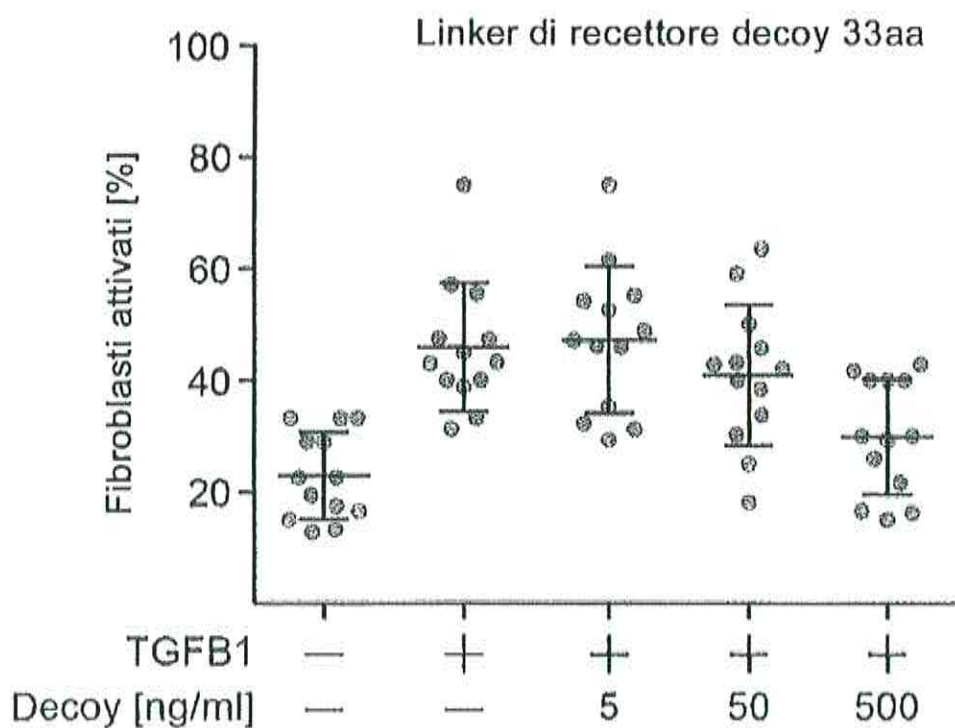


Figura 32B

SNP ID	Posizione (hg19)	Valore P	FDR	Genotipo	Allele minore	Sequenza	SEQ ID NO
rs10831850	11-12566917	1.76E-07	0.0248	G/A	A	GTAAGGGATGTAATCGGGTACTGA[A/G]GAAAGAG CCTGGATGCAGAGCCAGC	19
rs4756936	11-12599138	1.76E-07	0.0248	C/T	T	TTGATAACTTCAGCATCTGGATCAC[C/T]GTGGGATT AGCATCTGTTGTATTT	20
rs6485827	11-12578182	1.76E-07	0.0248	C/T	C	GTGTGATTGCTTAAAAAAAACACT[C/T]ACATTGTTT TGAATCACACCTCAC	21
rs7120273	11-12581045	1.44E-07	0.0248	T/C	T	GCTCAGCTAATCAATGACCAGTCTC[C/T]TTAAATCTT CTAATGCCCTATATGGT	22
rs895468	2-223621273	2.70E-07	0.0306	G/A	G	GCAGTGCTCAGAAGAGCAGCAGCCA[A/G]TGACATT TTGGGGCTATAAGAGGTA	23

Figura 33

SNP ID	Posizione (hg19)	Valore P	FDR	Genotipo	Allele minore	Sequenza	SEQ ID NO
rs1000574	19-55114775	0.0432	0.6581	C/T	T	TGTCAGTAAATACCTAACACATTTT[C/T]GTGCA ATGTATGTCATAAAATATGGG	24
rs10403345	19-56741808	0.0355	0.6372	G/A	G	GGgtgaagtttggaaacaggatcac[A/G]ttgtgatgcaatgtca gaaccaag	25
rs10419994	19-55726220	0.0334	0.6372	C/T	T	aaaccataGTATCATCCCTTCCCCAAA[C/T]AGTCAAC CCAGggaatcacagagat	26
rs10426177	19-56269096	0.0103	0.6372	C/T	T	TAAGACGCTATTCTCTAATTCTGAA[C/T]GGAAG AACTCCTCTCCCAAGACATG	27
rs11084337	19-54916104	0.0370	0.6372	C/T	C	aggTgaaacaacaaggggggg[C/T]gagggggcaattta aacattttct	28
rs11671244	19-56502995	0.0242	0.6372	C/A	A	TATTAGATTTTGTGTGGGATTTCAT[A/C]GTTAC ATTTGTTACCAGCCCCAATTT	29
rs11882068	19-56227165	0.0005	0.2204	A/G	G	GATTCCAGTCCAAAGTCACATCATC[A/G]CCAG CTGGAAAGACCTAGGGCAAAG	30
rs12104147	19-54935505	0.0150	0.6372	G/A	A	ACCATGACGGTGTCCCTCATTGCTTT[A/G]ACCAT TAGTAAatcattcatcattc	31
rs12608558	19-55715090	0.0275	0.6372	A/G	G	ACCTGTACATTTTGTGAGCTCCCA[A/G]CCAC CCCCCTACCAGTGTCCCTTATAA	32

rs12610132	19-55032293	0.0408	0.6372	A/G	G	GACACGATGCTTCAGTCTCCAGCT[A/G]AGCT TGGACTGTGAGGATGGGTCAG	33
rs12610617	19-56443519	0.0030	0.3650	C/T	T	CTCTCAAGTTTGCCACAGGGGATACG[C/T]GGGA AGTGCCCCCTGGGGGCCGACC	34
rs160104	19-56433203	0.0012	0.2352	G/T	T	ctggtctctccagctctgggct[G/T]ccagttattctgggtggtggc ctc	35
rs16986899	19-56549510	0.0265	0.6372	T/C	C	AACAAGGTGACAGACCAGGGAGTAA[C/T]GCCT CTCAGTGATGCCCTTGAGAGTC	36
rs17815373	19-56608900	0.0483	0.7007	G/A	A	CGGCAGGCAGTAGGATGGACTGCGT[A/G]GAC GGCGGCCAGCATGTAATGAAA	37
rs1895375	19-55035001	0.0329	0.6372	T/C	C	AAGTAAGGTGTCAAGGAGGCCATGC[C/T]CACT CTGTAGGTTCTAGGAAAGAAT	38
rs2043690	19-56383651	0.0305	0.6372	T/C	T	ATGCCTGAAGAACAAGAGCAAAT[C/T]GTCT CAGGAGGTAGGTAATAGGATG	39
rs2194	19-56257259	0.0064	0.5195	G/A	A	AGCATATTCATTGATTCCTTACAT[A/G]CAAAT GCTCCTTTTAAAGTGCTCAA	40
rs2288419	19-55693244	0.0140	0.6372	A/G	G	TCAGTACGTATTCCTGCATCAGTGC[A/G]TCCT GCGGTTCCCTCCAACAGTCAGC	41
rs2288521	19-55708557	0.0262	0.6372	T/C	T	AGTGGAGGCCCTGGAACCCGGGACGC[T]TGT ACAATTTCAACCCTGTGGGCAGA	42
rs2288527	19-55699077	0.0454	0.6738	A/G	G	TGCCATATAATCTCAGGGTGCAACG[A/G]ATAA ACAAGGGGTGATGCCCGAAGAA	43

rs2637107	19-56566741	0.0317	0.6372	G/A	A	CTCTGTCCCTCAACTTCTTTCTAC[A/G]TGGTC ATGTCCCTTCTTTAGTTCCCT	44
rs299164	19-56319796	0.0273	0.6372	A/C	C	GCAACAAAAATCTTATACATCACCA[A/C]ATGTC TGCTTAGCGGCAGAATTGCC	45
rs299169	19-56316796	0.0324	0.6372	G/A	G	GCTAGGTAAGGACTCTGAAAAATAC[A/G]GCAA CATGAAAAACATCCAGTCTCC	46
rs303997	19-56424443	0.0007	0.2204	T/C	T	TCCATTTGCCCAGTGCAGCATAGCC[C/T]GCAT TGCCAAAGGTGGTCTTCCCCAAC	47
rs304001	19-56423668	0.0015	0.2352	C/T	C	CGTTTAAACAAAAGACACTGAGAT[C/T]GAGG GCCTGGAAGTGCCTTTCATTG	48
rs304002	19-56423254	0.0141	0.6372	C/T	C	TTCTACGACTTTTCACTGCC[TACA/C/T]GAGTC CCAGGAGGAAGACTTTCACAA	49
rs306463	19-56497077	0.0068	0.5195	T/G	T	gccaaatgtttgaaaattccatt[G/T]gaagaaattagtggaatgc atTTT	50
rs310445	19-56173551	0.0396	0.6372	G/A	G	GAAGATTGTTCAAGAAAAAGCAGAG[A/G]GCAT GATGACAACACAAAAATGAAGA	51
rs3745429	19-54937593	0.0233	0.6372	A/G	G	CCTGGACTATCCCCTGGCCGGGCC[A/G]CAC ACATGTGCCCTGTGACCAGGGA	52
rs3786867	19-55684200	0.0394	0.6372	C/T	T	GCTGGCTGTGAGGAGTCCGCGAGAA[C/T]TCC CTTGCTTGTCATGAATTTATC	53
rs4629084	19-56420157	0.0243	0.6372	G/T	G	AAGGTGAAGAGTGGGAAAAGGCAGA[G/T]GATC AGGAAAAATAACTAATGGGTA	54

rs464765	19-56430224	0.0208	0.6372	A/C	A	ggctaataaaggaattagagagc[A/C]ctccctccctccaacat cttttc	55
rs4801278	19-56246520	0.0268	0.6372	G/A	A	TGGTCTGTGCTCTCCTTGACACTC[A/G]TCTGT GGACATCACAGGAGGGAACA	56
rs4801635	19-56372705	0.0352	0.6372	C/T	C	GTGCGTATATGTGTTACAAGTGGCT[C/T]GTGTT GACCGCCTGCCTGTGAAAG	57
rs516022	19-56609371	0.0408	0.6372	C/A	C	GCCTGGGTGCTGACCGGGGTGCC[A/C]TTG CTGGGCTTAGCAGGCCGGGCTT	58
rs6509882	19-55030183	0.0400	0.6372	A/G	G	TGATGTGCCACATCCTGTATAGAA[A/G]CAGG TGATGTGGAATGAGTCAGAC	59
rs6509883	19-55030376	0.0378	0.6372	A/G	G	CATGAAAACCCCTCAGATGGTACCA[A/G]AAAT ATAGACAA TTGATCCAGAGAG	60
rs6509933	19-55683104	0.0188	0.6372	T/C	T	gtcccagctactcacaggaggat[C/T]gcaggagtgaacc agcctgtgc	61
rs6509939	19-55851708	0.0337	0.6372	T/C	C	CACCCCTCAGGGCCCTCCCTGACCC[C/T]TCTC TCACCCCGGGACCTCCCTGC	62
rs8110255	19-56568978	0.0045	0.4527	T/C	C	GCAGGTCTGTGTTCCCTTGTATGTT[C/T]CCTTG CTACAGGCACTCTCAGCCTT	63
rs8112791	19-56723492	0.0236	0.6372	C/A	C	gtcagtttgaacaggtaaaaatac[A/C]aatgctcatgttctaca 999aaa	64
rs873732	19-56745520	0.0194	0.6372	G/A	A	AGCCAAATTCGTCAAGTGAATGAGGCA[A/G]AGAA ATTGGTAAAAAGAAAGAAAGT	65

Figura 34

SNP ID	Posizione (hg19)	Valore P	FDR	Genotipo	Allele minore	Sequenza	SEQ ID NO
rs2823699	21-17628689	1.62E-08	0.0033	T/C	T	TACATAGTGGCTTAAGAGCAAATG[C/T]CTACC TTTTCCCTCTGTTTTCAACTC	66
rs4973978	3-41667545	1.69E-08	0.0033	T/G	G	GTTGGTTGGTTTGTTCCTTAA[G/T]GGTGC CATTTAATGACAGATTTTCAT	67
rs11744285	5-124622296	1.75E-08	0.0033	A/G	G	GCCCCGGTGACAAGAATGGCAAAAC[A/G]TTTA TTCGGCATTAAACAATGTGTAA	68
rs7120273	11-12581045	3.32E-08	0.0041	T/C	T	GCTCAGCTAATCAATGACCAGTCTC[C/T]TTAAT TCTTCTAATGCCTATATGGT	69
rs10831850	11-12566917	5.12E-08	0.0041	G/A	A	GTAAGGGATGTGAATCGGGTACTGA[A/G]GAAA GAGCCTGGATGCAGAGCCAGC	70
rs4756936	11-12599138	5.12E-08	0.0041	C/T	T	TTGATAACTTCAGCATCTGGATCAC[C/T]GTGG GATTAGCATCTGTTTGTATTT	71
rs6485827	11-12578182	5.12E-08	0.0041	C/T	C	GTGTGATTGCTTAAAAAAACTACT[C/T]ACATT GTTTTGAATCACACCTCACA	72

rs7079768	10- 131271870	9.92E- 08	0.0070	G/A	A	ACTTGTGCCAGGCTGGCTTTGCAAC[A/G]ATGA GCCTGAGAAGCTGTTAGAAGT	73
rs1293764	12- 113425679	1.27E- 07	0.0080	A/G	A	GAGACACAAGAGGTGGGCAGGTCTT[A/G]GGG ATTTAGGAGTTGGGTTCAAGGC	74
rs1862945	7-50936184	6.84E- 07	0.0387	G/A	A	TGAGTCTGTGAGGAGAAATGAACAA[A/G]TCTA CCACAGTCATCCAGAATGAGA	75
rs10496038	2-55340963	9.41E- 07	0.0484	C/T	T	ATCAGAAAGGCTAAGGAAACCACCTG[C/T]TAATA GTCTGGTGCCCAACACACAGGC	76
rs12669489	7-50961697	1.05E- 06	0.0493	G/A	A	catcaataagaaaaaataat[A/G]taataagaaaaatgcat aagagact	77

Figura 35

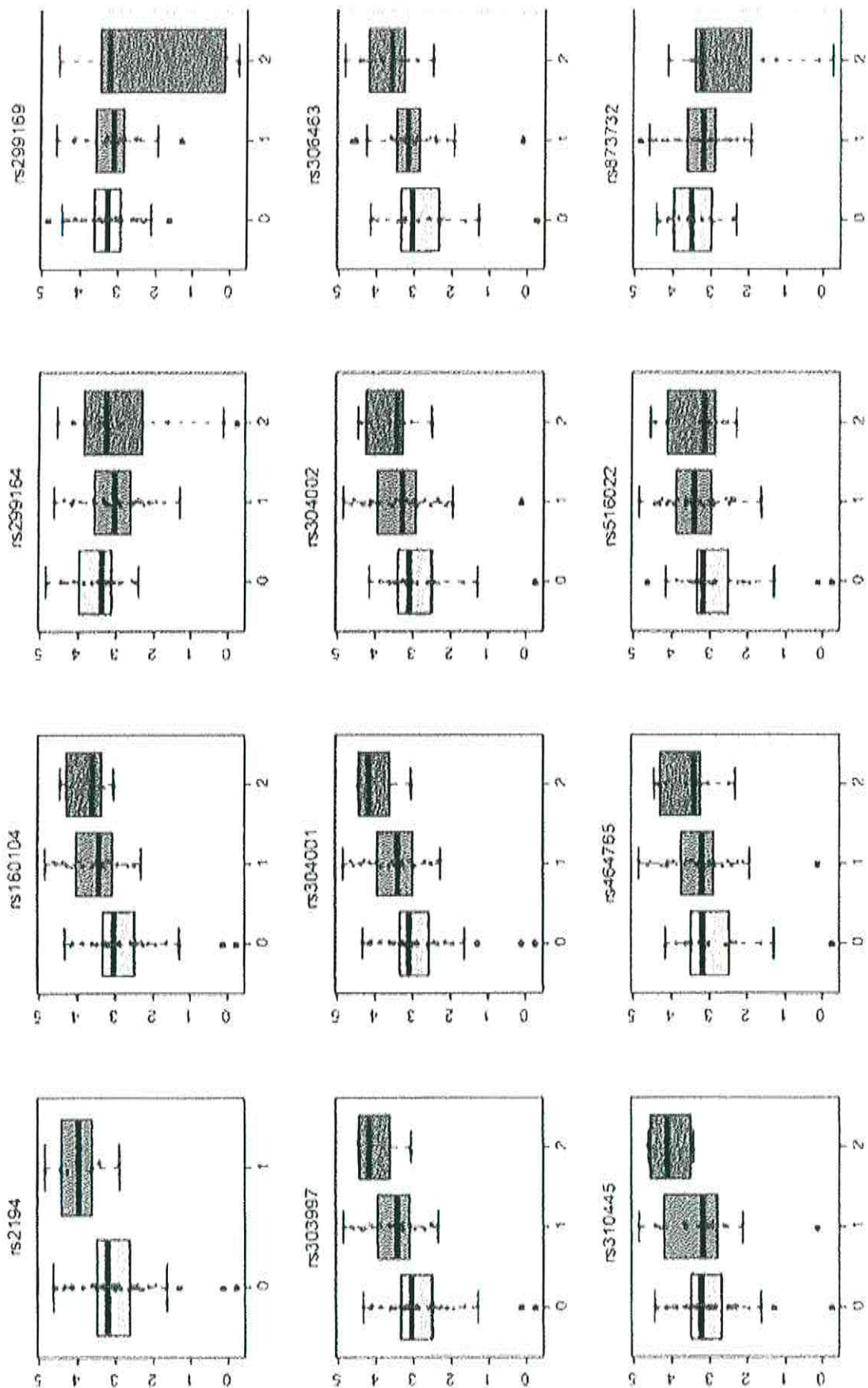


Figura 36A

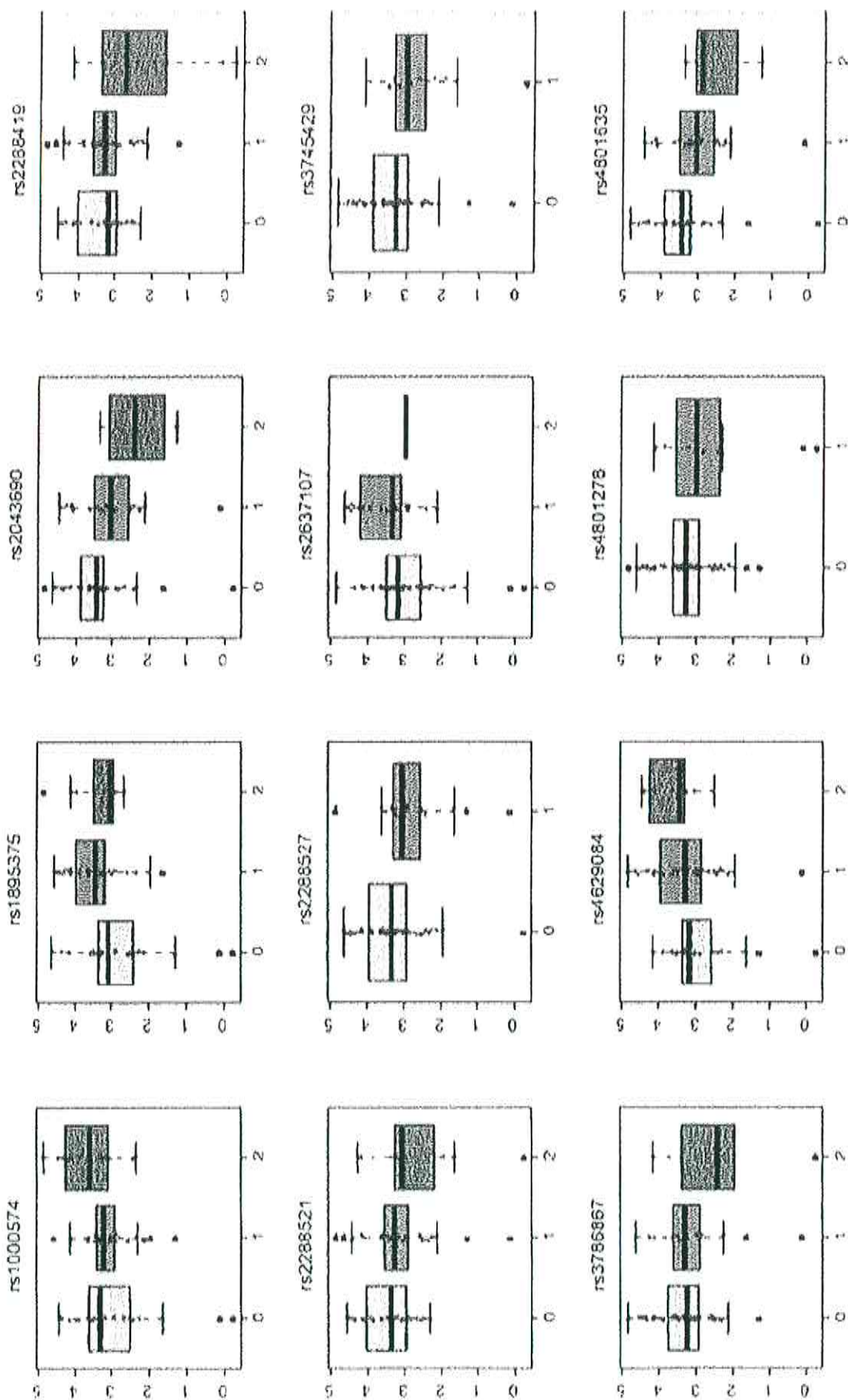


Figura 36B

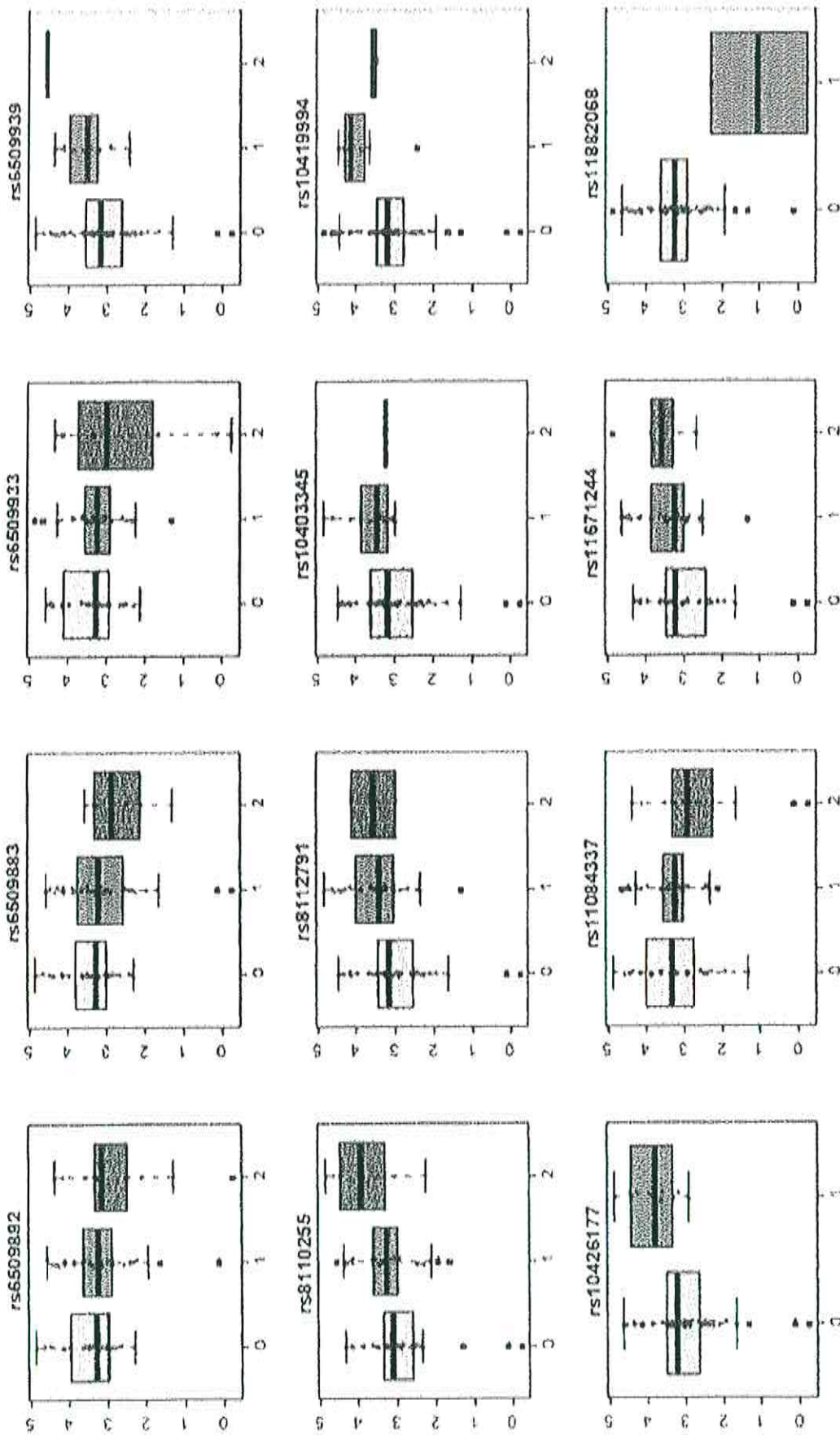


Figura 36C

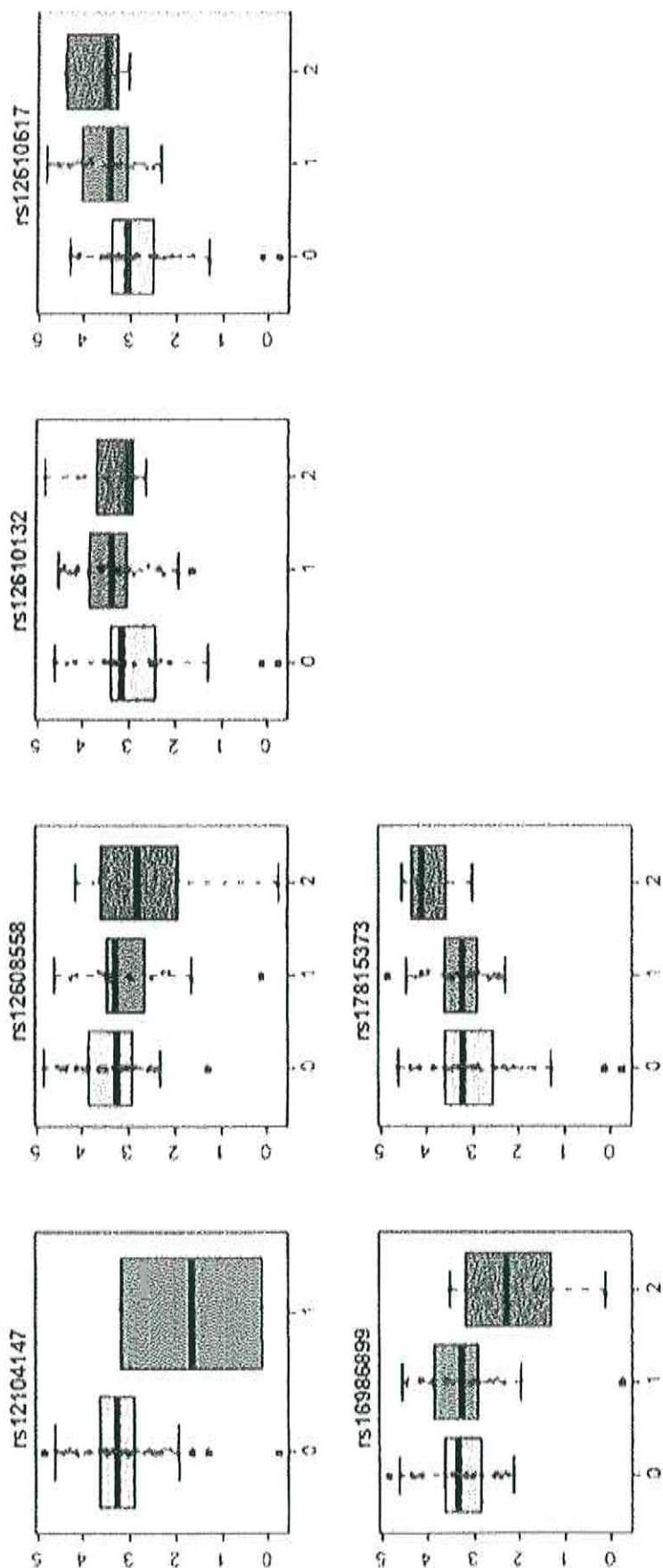


Figura 36D

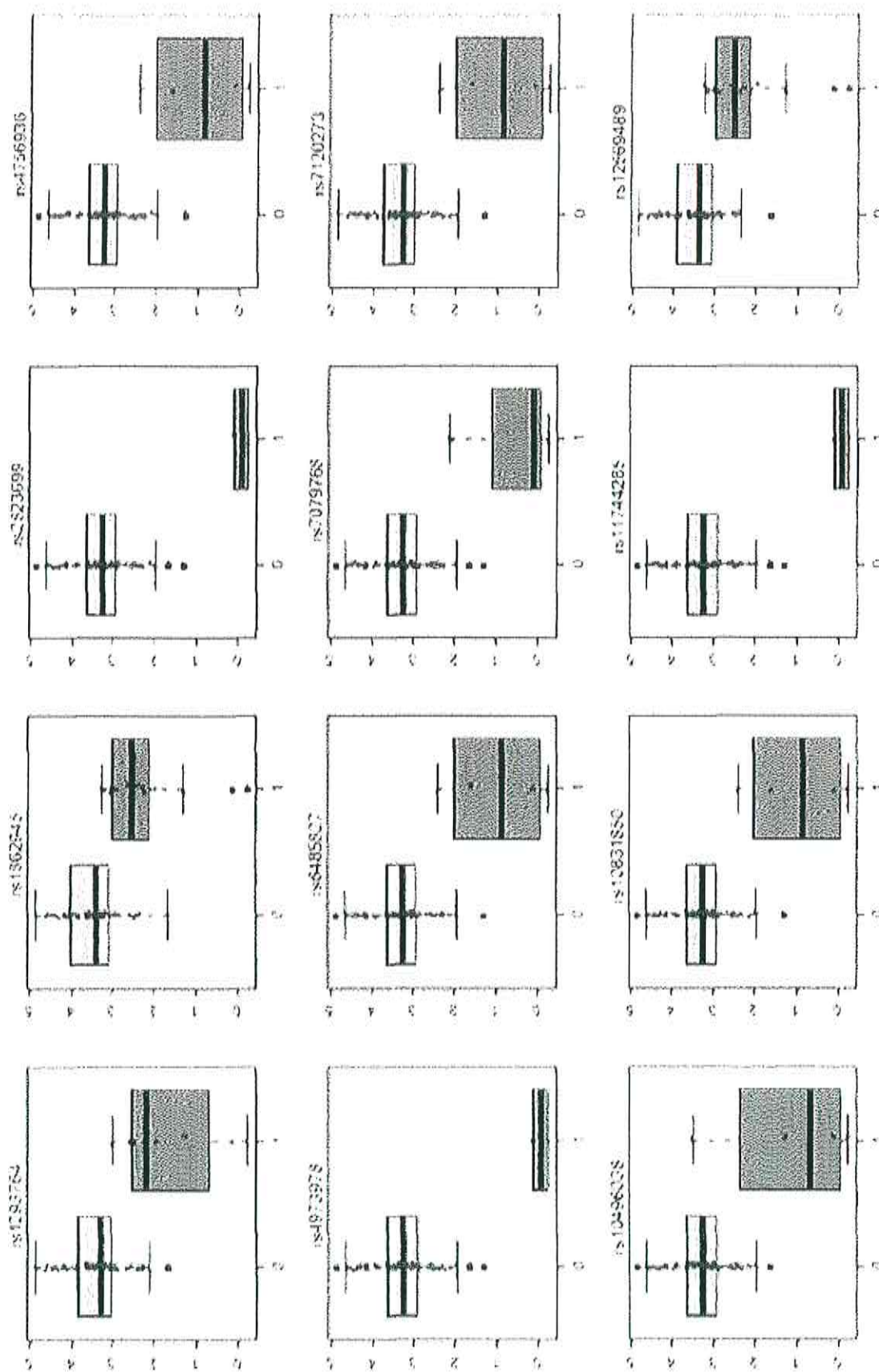


Figura 37

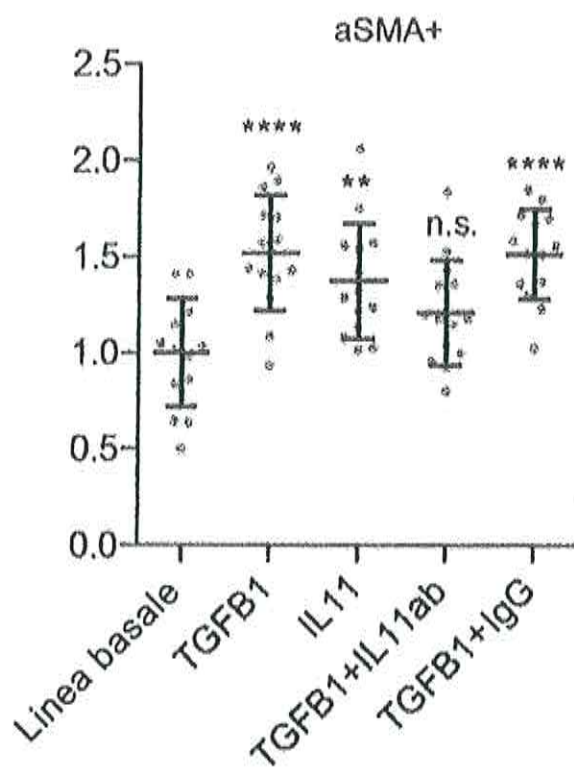


Figura 38A

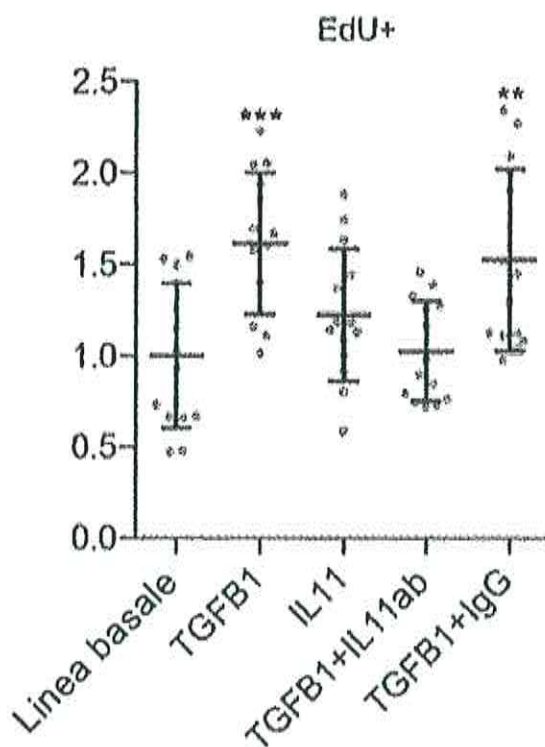


Figura 38B

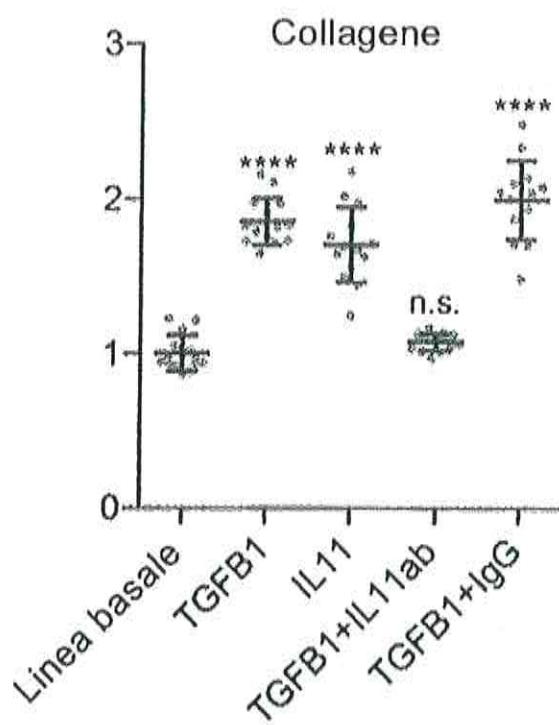


Figura 38C

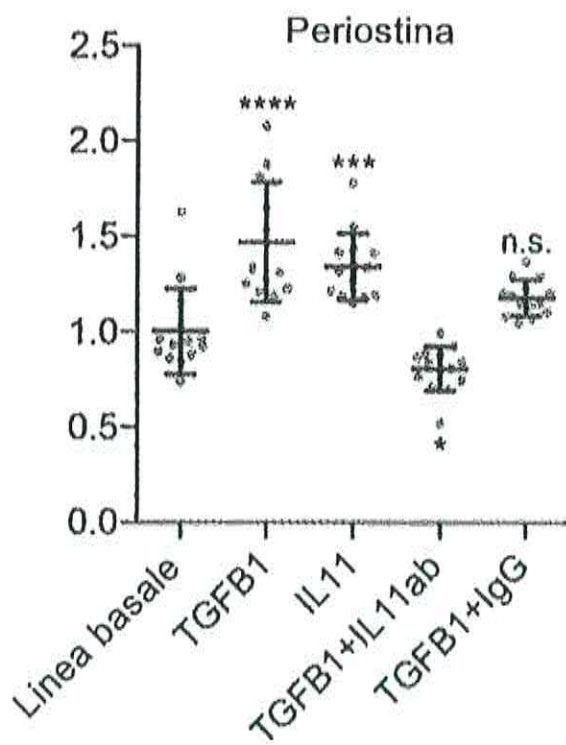


Figura 38D

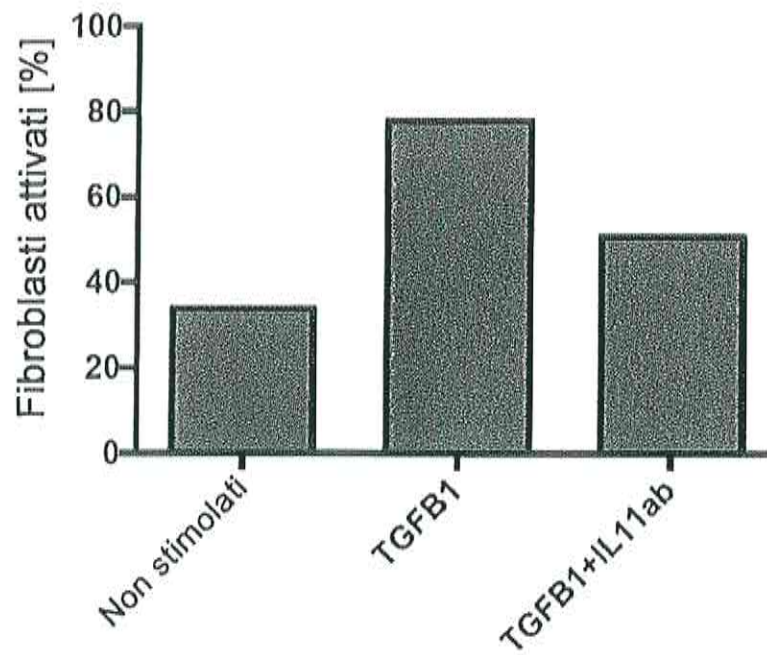


Figura 39

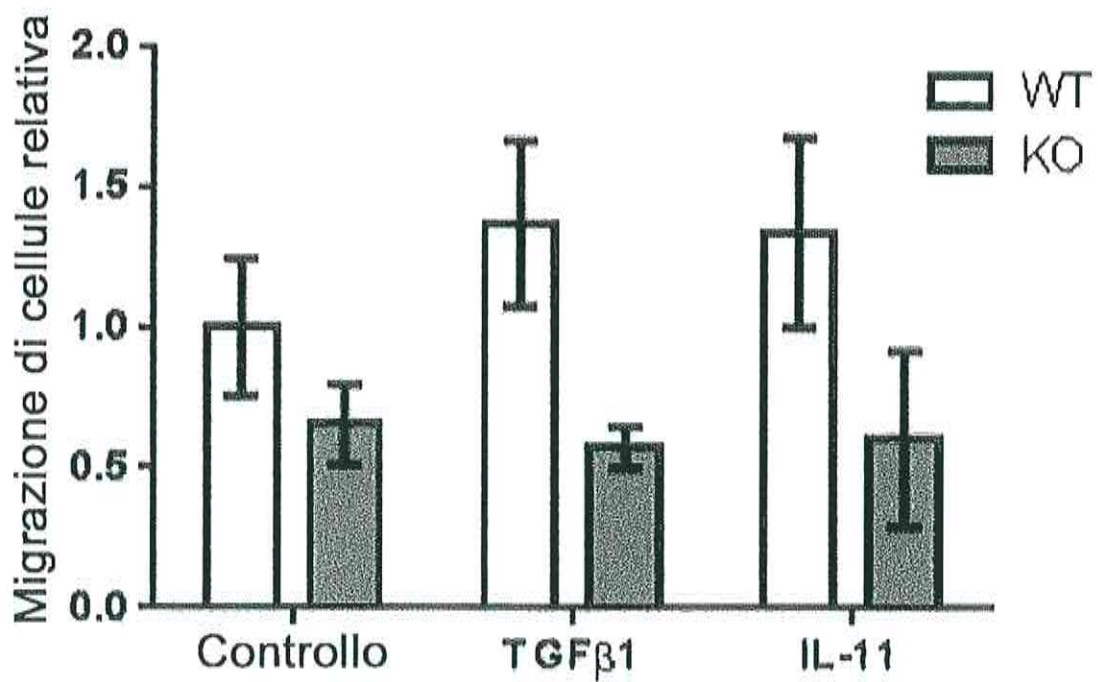


Figura 40