(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113677706 B
(45)授权公告日 2025.05.02

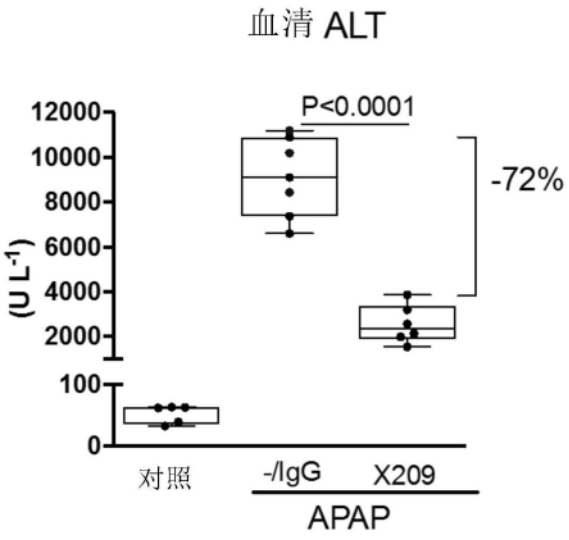
(21)申请号 202080010280.8
(22)申请日 2020.01.21
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113677706 A
(43)申请公布日 2021.11.19
(30)优先权数据
1900811.9 2019.01.21 GB
1907839.3 2019.06.03 GB
1915003.6 2019.10.17 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/051332 2020.01.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/152122 EN 2020.07.30
(73)专利权人 新加坡保健服务私人有限公司
地址 新加坡新加坡市
专利权人 新加坡国立大学
(72)发明人 S·A·库克 S·谢弗
A·A·维迪亚
(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 徐迅 崔佳佳
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61K 31/167(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
A61P 39/02(2006.01)
(56)对比文件
Anissa A. Widjaja等."Redefining Interleukin 11 as a regeneration-limiting hepatotoxin.《bioRxiv》.2019,第1-40页.
审查员 张强
权利要求书1页 说明书74页
序列表15页 附图67页

(54)发明名称

肝毒性的治疗

(57)摘要

公开了通过抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导来治疗和预防肝毒性的方法,以及用于此类方法的药剂。



CN 113677706 B

1.一种能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂在制备用于治疗或预防对乙酰氨基酚诱导的肝损伤的方法中的药物或组合物中的用途,其中所述能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂为IL-11介导的信号传导的拮抗剂,其选自:(i)抗IL-11抗体或其抗原结合片段,或(ii)抗IL-11Rα抗体或其抗原结合片段。

2.根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述组合物还包括N-乙酰半胱氨酸。

3.根据权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述对乙酰氨基酚诱导的肝损伤的特征为患有所述对乙酰氨基酚诱导的肝损伤的受试者体内已确定白细胞介素11(IL-11)或白细胞介素11受体(IL-11R)表达上调。

肝毒性的治疗

[0001] 本申请要求于2019年1月21日提交的GB 1900811.9、2019年6月3日提交的GB 1907839.3和2019年10月17日提交的GB 1915003.6的优先权,其内容和要素出于所有目的通过引用合并于此。

发明领域

[0002] 本发明涉及与肝毒性相关的疾病和病症的诊断、治疗和预防。

[0003] 发明背景

[0004] 肝毒性是指对肝脏的毒性损害,特别是肝脏内肝细胞的功能障碍和死亡。它通常是由化学物质驱动的,例如药物、化学物质(如酒精)、草药或膳食补充剂造成的肝脏损害或损伤。肝毒性也可能由感染(例如由肝炎病毒)、营养不良或遗传疾病引起。

[0005] 止痛药对乙酰氨基酚(APAP,N-乙酰基-对氨基酚,或扑热息痛)通常用于退烧和轻度至中度疼痛。对乙酰氨基酚过量是肝损伤的一个普遍原因,在美国每年造成多达80000次急诊,2500次住院和500次致命中毒(Lee WM.,肝脏病学(2004)40(1):6-9;Budnitz DS等人,Am J Prev Med(2011)40(6):585-92)。此外,慢性使用低剂量对乙酰氨基酚可导致肝损伤,特别是在存在其他易感因素的情况下,如慢性饮酒(酗酒)、禁食、营养不良、HIV感染、肝炎病毒感染、癌症和药物相互作用(McClain等人,Curr.Gastroenterol.Rep.,1999;1:42-49)。

[0006] 对乙酰氨基酚所致肝毒性的病理生理学多年来得到了广泛的研究。摄入对乙酰氨基酚后对肝脏的损害不是由于药物本身,而是由于一种毒性代谢产物N-乙酰基-对苯醌亚胺(NAPQI),它是通过肝脏中的细胞色素P450组酶产生的。NAPQI在正常情况下是无害的,它与内源性谷胱甘肽结合后被从体内移除。然而,过量服用的对乙酰氨基酚通过细胞色素P450(CYP450)的生物转化,主要是CYP2E1同种型,由于谷胱甘肽耗竭导致过量NAPQI的积累。这反过来又导致肝细胞损伤和增加细胞死亡(Jollow等人,J Pharmacol Exp Ther,1973年10月;187(1):195-202;Dahlin等人,Proc Natl Acad Sci U.S.A.,1984年3月;81(5):1327-31;Moore等人,《生物化学学报》第260卷,第24期,10月25日,第13035-13040页,1985年;Kyle等人,《生化药理学》第40卷,第6期,1990年9月15日)。肝损伤可以通过给药N-乙酰半胱氨酸来限制,它补充肝脏的谷胱甘肽水平。需要进一步的治疗和预防方法。

[0007] 据报道细胞因子白细胞介素11(IL-11)具有对对乙酰氨基酚引起的肝损害和毒性的保护性作用(Trepicchio WL等人,Toxicol Pathol.2001;29(2):242-9;Nishina T等人,J Biol Chem.2017;292(1):205-216)。STAT3通路被细胞因子如IL-11激活已被证明能够驱动肝细胞代偿性增殖,这是肝脏再生的一个关键原则,给药IL-11和其他STAT3激活细胞因子被认为是APAP毒性的治疗方法(Mühl H,Front Immunol,2016 2;7:163)。Nishina T等人,Sci Signal.,2012;5(207):ra5报道IL-11在氧化应激和肝细胞代偿性增殖之间提供了功能联系,并发现IL-11受体激动剂能促进肝细胞增殖,改善对乙酰氨基酚所致肝损伤的氧化应激。

[0008] IL-11治疗也被报道可以预防和/或治疗其他肝脏疾病,如肝脏缺血/再灌注损伤、

与慢性丙型肝炎(HpC-ITP)相关的免疫性血小板减少性紫癜(ITP)、急性内毒素血症和T细胞介导的肝损伤(Yu J等人,Clin Res Hepatol Gastroenterol.,2016;40(5):562-570;Zhu M等人,PLoS ONE 10(5):e0126296;Fontana V等人,Acta Haematol.,2008;119(2):126-32;Maeshima等人,Shock.,(2004)21(2):134-8;Bozza等人,Hepatology(1999)30(6):1441-7)。

[0009] 发明概述

[0010] 与报道的IL-11在肝损伤中的保护作用相反,本发明涉及通过抑制IL-11信号传导来治疗和/或预防肝毒性和与肝毒性相关的障碍、疾病或病症。

[0011] 在本发明的一个方面,提供了一种能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂在治疗或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法中的用途。

[0012] 在本发明的另一个方面,提供了能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂的用途,用于制造用于治疗或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法中的药物。

[0013] 在本发明的另一方面,提供了一种治疗或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量的能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂。

[0014] 在一些实施方式中,所述药剂是能够防止或减少白细胞介素11(IL-11)与白细胞介素11受体(IL-11R)结合的药剂。

[0015] 在一些实施方式中,所述药剂能够结合白细胞介素11(IL-11)或白细胞介素11的受体(IL-11R)。在一些实施方式中,所述药剂选自下组:抗体或其抗原结合片段、多肽、肽、核酸、寡核苷酸、适体或小分子。所述药剂可以是抗体或其抗原结合片段。所述药剂可以是诱饵受体。

[0016] 在一些实施方式中,所述药剂是IL-11介导的信号传导的抗IL-11抗体拮抗剂,或其抗原结合片段。在一些实施方式中,所述药剂是IL-11介导的信号传导的抗IL-11Rα抗体拮抗剂,或其抗原结合片段。

[0017] 在一些实施方式中,所述药剂是IL-11的诱饵受体。在一些实施方式中,IL-11的诱饵受体包括:(i)对应于gp130的细胞因子结合模块的氨基酸序列和(ii)对应于IL-11Rα的细胞因子结合模块的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方式中,所述药剂是IL-11突变蛋白。在一些实施方式中,所述IL-11突变蛋白是W147A。

[0019] 在一些实施方式中,所述药剂能够防止或减少白细胞介素11(IL-11)或白细胞介素11受体(IL-11R)的表达。所述药剂可以是寡核苷酸或小分子。

[0020] 在一些实施方式中,所述药剂是能够阻止或减少IL-11表达的反义寡核苷酸。在一些实施方式中,能够阻止或减少IL-11表达的反义寡核苷酸是靶向IL11的siRNA,包括SEQ ID NO:12、13、14或15的序列。在一些实施方式中,所述药剂是能够阻止或减少IL-11Rα表达的反义寡核苷酸。在一些实施方式中,能够阻止或减少IL-11Rα表达的反义寡核苷酸是靶向IL11RA的siRNA,包括SEQ ID NO:16、17、18或19的序列。

[0021] 在本文提供的任何实施方式中,所述白细胞介素11受体是或包含IL-11Rα。

[0022] 在本文提供的任何实施方式中,所述药剂可以在肝毒性病因(例如给药或服用肝

毒性药物或暴露于肝毒性的环境来源)之前、结合或之后给药。

[0023] 在本文提供的任何实施方式中,与肝毒性相关的障碍、疾病或病症是在病理上涉及肝毒性的疾病。

[0024] 在一些实施方式中,所述在病理上涉及肝毒性的疾病选自:药物性肝损伤(DILI)、急性肝损伤(ALI)、急性肝衰竭、急性肝病、慢性肝病、肝损害、肝炎、病毒性肝炎、酒精性肝炎、肝缺血再灌注损伤(IRI)、热缺血再灌注(WIR)、放射性肝病(RILD)、特异性药物性肝损伤(IDILI)、自身免疫性肝损伤、胆汁淤积性肝病、HIV、和癌症。

[0025] 在任何实施方式中,本文提供了用于治疗和/或预防药物性肝损伤(DILI)的药剂、用途和方法。所述DILI可以是内源性和/或特异性肝毒性。在任何实施方式中,本文提供了用于治疗和/或预防对乙酰氨基酚(APAP)诱导的肝毒性的药剂、用途和方法。在一些实施方式中,所述方法还包括用N-乙酰半胱氨酸治疗。

[0026] 在任何实施方式中,所述治疗或预防的方法包括向白细胞介素11(IL-11)或IL-11受体(IL-11R)表达上调的受试者施用所述药剂。

[0027] 在任何实施方式中,所述治疗或预防的方法包括向白细胞介素11(IL-11)或白细胞介素11(IL-11R)受体表达被确定为上调的受试者施用所述药剂。

[0028] 在一些实施方式中,所述治疗或预防的方法包括确定在受试者中白细胞介素11(IL-11)或IL-11受体(IL-11R)的表达是否上调,并向白细胞介素11(IL-11)或IL-11受体(IL-11R)的表达上调的受试者施用所述药剂。

[0029] 还提供了一种确定受试者是否适合用能够抑制白介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂治疗或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法,所述方法包括任选地在体外确定白介素11(IL-11)或IL-11受体(IL-11R)在受试者中的表达是否上调。

[0030] 还提供了一种用能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂来选择治疗或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括任选地在体外确定白介素11(IL-11)或IL-11受体(IL-11R)在受试者中的表达是否上调。

[0031] 在一个方面,提供了一种诊断受试者的肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症,或发展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的风险的方法,所述方法包括任选地在体外确定从受试者获得的样品中白细胞介素11(IL-11)或IL-11受体(IL-11R)的上调。在一些实施方式中,所述诊断方法是在疑似患有肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的受试者中确认肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的诊断的方法。在一些实施方式中,诊断和/或确认诊断的方法包括选择受试者用能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂进行治疗。

[0032] 还提供了一种为患有或疑似患有肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的受试者提供预后的方法,所述方法包括任选地在体外确定从受试者获得的样品中白细胞介素11(IL-11)或白细胞介素11受体(IL-11R)的表达是否上调,并且基于该测定,提供用能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂治疗的受试者的预后。在一些实施方式中,提供预后的方法包括选择被确定为具有上调的白介素11(IL-11)或白介素11受体(IL-11R)的表达的受试者,以用能够抑制白介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂进行治疗。

[0033] 在另一方面,提供了一种诊断肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症或发

展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的风险的方法,所述方法包括任选地在体外确定所述受试者中预测的IL-11或IL-11受体表达上调或IL-11介导的信号传导上调的一个或多个遗传因子。在一些实施方式中,所述方法包括选择受试者用能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药物进行治疗。

[0034] 还提供了一种为患有或疑似患有肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的受试者提供预后的方法,所述方法包括任选地在体外确定所述受试者中预测的IL-11或IL-11受体表达上调或IL-11介导的信号传导上调的一个或多个遗传因子。

[0035] 详述

[0036] 有效地预防和治疗肝毒性,如药物性肝损伤(DILI)引起的肝毒性是一直以来的需求。对乙酰氨基酚(APAP)过量引起的肝损害是肝毒性的常见原因。

[0037] 一般地说,细胞因子IL-11被反复报道对APAP引起的肝损害和肝毒性有保护作用。然而,相反地,本发明人发现抑制IL-11介导的信号传导可以有效地改善APAP诱导的肝毒性,从而提出了治疗和/或预防肝毒性的新方法。

[0038] 白细胞介素11和IL-11受体

[0039] 白细胞介素11(IL-11)又称脂肪生成抑制因子,是一种多效性细胞因子,并且是细胞因子IL-6家族的一个成员,包括IL-6、IL-11、IL-27、IL-31、抑瘤素、白血病抑制因子(LIF)、心肌营养素-1(CT-1)、心肌营养素样细胞因子(CLC)、睫状神经营养因子(CNTF)和神经生成素(NP-1)。

[0040] 白细胞介素11(IL-11)在多种类型的间充质细胞中表达。IL-11基因组序列已被定位到19号染色体和7号染色体着丝粒区,并由一种确保细胞有效分泌的经典信号肽转录。IL-11的激活蛋白复合物cJun/AP-1位于其启动子序列中,对IL-11的基础转录调控至关重要(Du和Williams.,血液1997,Vol 89:3897-3908)。人IL-11的未成熟形式是一个199个氨基酸的多肽,而成熟形式的IL-11编码一个178个氨基酸残基的蛋白质(Garbers和Scheller.,Biol.Chem.,2013;394(9):1145-1161)。人IL-11氨基酸序列可在UniProt登录号P20809(P20809.1GI:124294;SEQ ID NO:1)下获得。重组人IL-11(奥普瑞白介素(oprelvekin))也已上市。来自其他物种(包括小鼠、大鼠、猪、牛、几种硬骨鱼和灵长类动物)的IL-11也被克隆和测序。

[0041] 在本说明书中,“IL-11”指来自任何物种的IL-11,并包括来自任何物种的IL-11的同种型、片段、变体或同源物。在优选实施方式中,所述物种是人类(智人)。IL-11的同种型、片段、变体或同源物可以任选地被表征为与来自给定物种(例如人类)的未成熟或成熟IL-11的氨基酸序列具有至少70%,优选地为80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的氨基酸序列同一性。IL-11的同种型、片段、变体或同源物可任选地被表征为结合IL-11Rα(优选来自相同物种)和刺激表达IL-11Rα和gp130的细胞中的信号转导的能力(例如,如Curtis等人,血液,1997,90(11);或者Karpovich等人,Mol.Hum.Reprod.,2003 9(2):75-80)。IL-11的片段可以是任何长度(按氨基酸数计),尽管可以任选地是成熟IL-11长度的至少25%,并且可以具有成熟IL-11长度的50%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之一的最大长度。IL-11片段的最小长度为10个氨基酸,最大长度为15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或195个氨基酸之一。

[0042] IL-11通过广泛表达的糖蛋白130(GP130;也称为糖蛋白130、IL-6ST、IL-6-β或CD130)的同源二聚体发出信号。Gp130是一种跨膜蛋白,与IL-6受体家族形成I型细胞因子受体的一个亚基。特异性是通过一个单独的白细胞介素11受体亚单位α(IL-11Rα)获得的,它不直接参与信号转导,尽管最初的细胞因子与α-受体结合事件导致最终与gp130形成复合物。

[0043] 人gp130(包括22个氨基酸的信号肽)是一个918个氨基酸的蛋白,成熟形式为866个氨基酸,包括597个氨基酸的胞外结构域、22个氨基酸的跨膜结构域和277个氨基酸的胞内结构域。该蛋白的胞外结构域包括gp130的细胞因子结合模块(CBM)。gp130的CBM包括gp130的Ig样结构域D1和纤维连接蛋白Ⅲ型结构域D2和D3。人gp130的氨基酸序列在UniProt登录号P40189-1(SEQ ID NO:2)下可获得。

[0044] 人IL-11Rα是一个422个氨基酸的多肽(UniProt Q14626;SEQ ID NO:3),与小鼠IL-11Rα有85%的核苷酸和氨基酸序列同一性。IL-11Rα的两种同种型已被报道,它们在细胞质结构域不同(Du和Williams,见上文)。IL-11受体α链(IL-11Rα)与IL-6受体α链(IL-6Rα)在结构和功能上有许多相似之处。胞外结构域显示24%的氨基酸同一性,包括特征性保守的Trp-Ser-X-Trp-Ser(WSXWS)基序。短胞质结构域(34个氨基酸)缺乏激活JAK/STAT信号通路所需的盒1(Box1)和盒2(Box 2)区域。

[0045] 对小鼠IL-11受体结合位点进行了定位,并确定了I、II和III三个位点。与gp130的结合通过位点II区和位点III区的取代而减少。位点III突变体未显示可检测的激动剂活性,并具有IL-11Rα拮抗剂活性(《细胞因子抑制剂》第8章;由Gennaro Ciliberto和Rocco Savino编辑,Marcel Dekker有限公司,2001)。

[0046] 在本说明书中,IL-11(IL-11R)受体是指能够结合IL-11的多肽或多肽复合物。在一些实施方式中,IL-11受体能够结合IL-11并诱导表达该受体的细胞中的信号转导。

[0047] IL-11受体可以来自任何物种,并包括来自任何物种的IL-11受体的同种型、片段、变体或同源物。在优选实施方式中,所述物种是人类(智人)。

[0048] 在一些实施方式中,IL-11受体可以是或可以包含IL-11Rα。在一些实施方式中,IL-11受体可以是包含IL-11Rα的多肽复合物。在一些实施方式中,IL-11受体可以是或可以包含gp130。在一些实施方式中,IL-11受体可以是包含gp130的多肽复合物。在一些实施方式中,IL-11受体可以是包含IL-11Rα和gp130的多肽复合物。在一些实施方式中,IL-11受体可以是gp130,或者包含与IL-11结合的gp130的复合物。

[0049] IL-11Rα的同种型、片段、变体或同源物可任选地表征为与来自给定物种例如人的IL-11Rα的氨基酸序列具有至少70%,优选80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的氨基酸序列同一性。IL-11Rα的同种型、片段、变体或同源物可任选地被表征为结合IL-11(优选来自相同物种)和刺激表达IL-11Rα和gp130的细胞中的信号转导的能力(例如,如Curtis等人,血液,1997,90(11);或者Karpovich等人,Mol.Hum.Reprod.,2003 9(2):75-80)。IL-11受体的片段可以是任何长度(按氨基酸数计),尽管可以任选地至少是成熟IL-11Rα长度的25%,并且具有成熟IL-11Rα长度的50%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之一的最大长度。IL-11受体片段的片段的最小长度为10个氨基酸,最大长度为15、20、25、30、40、50、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400或415个氨基酸之一。

[0050] IL-11信号传导

[0051] IL-11与IL-11Rα的结合具有低亲和力(Kd～10nmol/L),并且仅这些结合伙伴之间的相互作用不足以传递生物信号。能够信号转导的高亲和力受体(Kd～400至800pmol/L)的产生需要IL-11Rα和gp130的共同表达(Curtis等人,Blood,1997;90(11):4403-12;Hilton等人,EMBO J 13:4765,1994;Nandurkar等人,Oncogene,12:585,1996)。IL-11与细胞表面IL-11Rα的结合主要通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联和Janus激酶/信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)通路诱导异源二聚化、酪氨酸磷酸化、gp130激活和下游信号传导(Garbers和Scheller,见上文)。

[0052] 原则上,可溶性IL-11Rα也可以与IL-11形成生物活性的可溶性复合物(Pflanz等人,1999FEBS Lett,450,117-122),这增加了与IL-6类似,IL-11在某些情况下可以在结合细胞表面gp130之前结合可溶性IL-11Rα的可能性(Garbers和Scheller,见上文)。Curtis等人(Blood,1997年12月1日;90(11):4403-12)描述了可溶性小鼠IL-11受体α链(sIL-11R)的表达,并检查了表达gp130的细胞中的信号传导。在gp130而非跨膜IL-11R存在的情况下,sIL-11R介导M1白血病细胞的IL-11依赖性分化和BA/F3细胞的增殖,以及类似于通过跨膜IL-11R信号转导的早期细胞内事件,包括gp130、STAT3和SHP2的磷酸化。最近证实了通过细胞膜结合的gp130通过与可溶性IL-11Rα结合的IL-11激活信号传导(Lokau等人,2016Cell Reports 14,1761-1773)。这种所谓的IL-11反式信号传导可能在疾病发病机制中起重要作用,但其在人类疾病中的作用尚未被研究。

[0053] 如本文所用,“IL-11反式信号传导”是指由结合于IL-11Rα的IL-11结合到gp130而触发的信号传导。IL-11可能以非共价复合物的形式与IL-11Rα结合。gp130是膜结合的,由IL-11:IL-11Rα复合物与gp130结合后发生信号传导的细胞表达。在一些实施方式中,IL-11Rα可以是可溶性的IL-11Rα。在一些实施方式中,所述可溶性IL-11Rα是IL-11Rα的可溶性(分泌)同种型(例如缺乏跨膜结构域)。在一些实施方式中,所述可溶性IL-11Rα是细胞膜结合的IL-11Rα的胞外结构域蛋白水解裂解的释放产物。在一些实施方式中,IL-11Rα可以是细胞膜结合的,并且通过gp130的信号传导可以由结合于细胞膜结合的IL-11Rα(称为“IL-11”)的IL-11结合触发,称为“顺式信号传导”。

[0054] IL-11介导的信号转导已被证实可刺激造血和血小板生成,刺激破骨细胞活性,刺激神经发生,抑制脂肪发生,降低促炎性细胞因子表达,调节细胞外基质(ECM)代谢,并介导胃肠上皮细胞的正常生长控制(Du和Williams,见上文)。

[0055] 白细胞介素11(IL-11)的生理作用尚不清楚。IL-11与造血细胞的激活和血小板的产生密切相关。IL-11也被证明对移植物抗宿主病、炎症性关节炎和炎症性肠病具有保护作用,这导致IL-11被认为是一种抗炎细胞因子(Putoczki和Ernst,Jleukoc Biol 2010,88(6):1109-1117)。然而,IL-11不仅具有抗炎作用,而且具有促炎、促血管生成作用,并且对肿瘤的发生具有重要意义。最近的研究表明,在小鼠关节炎模型和癌症中,IL-11在病毒诱导的炎症期间很容易检测到,提示病理刺激可以诱导IL-11的表达。IL-11还与肿瘤胃肠上皮中促进肿瘤的靶基因的Stat3依赖性激活有关(Putoczki和Ernst,见上文)。

[0056] 如本文所用,“IL-11信号传导”和“IL-11介导的信号传导”是指通过IL-11或其具有成熟IL-11分子功能的片段与IL-11受体结合而介导的信号传导。应当理解,“IL-11信号传导”和“IL-11介导的信号传导”是指由IL-11/其功能片段启动的信号传导,例如通过与

IL-11受体结合。“信号传导”又指信号转导和其他控制细胞活动的细胞过程。

[0057] 肝毒性

[0058] 本发明的各方面涉及肝毒性和以肝毒性为特征的障碍、疾病和病症的诊断、治疗和预防。

[0059] 如本文所用,“肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病”是指肝毒性、与肝毒性相关的障碍、与肝毒性相关的疾病或与肝毒性相关的病症。

[0060] 如本文所用,肝毒性是指肝细胞/组织的损伤和/或死亡。肝毒性可指对肝脏的毒性损害,特别是肝脏内肝细胞的死亡。肝毒性可以通过检测如下文所述的一个或多个肝毒性相关性来确定/诊断。

[0061] 肝毒性可能是肝毒性损伤的结果。如本文所用,“肝毒性”是指任何引起肝毒性的治疗、事件或条件。例如,肝毒性损伤可能是由化学/物理治疗/经历或气体条件引起的。在一些实施方式中,肝毒性损伤是化学的,例如在药物诱导的肝损伤的情况下,例如APAP诱导的肝毒性。在一些实施方式中,肝毒性损伤是物理性的,例如,在由于对肝组织的外科损伤而产生的肝毒性的情况下,这可能发生于例如治疗疾病和/或用于肝移植的外科手术(例如,肝毒性可能具有医源性原因)。在一些实施方式中,肝毒性损伤产生于缺氧,例如作为缺血的结果,或者可能产生于再灌注(例如,肝毒性损伤可能产生于IRI)。

[0062] 肝毒性可能是化学引起的肝损害,例如药物、化学物质、缺血、再灌注、败血症或草药或膳食补充剂造成的损害或损伤。在一些实施方式中,肝毒性是指药物性肝损伤(DILI)。在一些实施方式中,肝毒性是指由肝毒素引起的肝损伤。肝毒素可以是酒精。肝毒性也可称为中毒性肝炎。肝毒性可指急性和/或慢性肝毒性。

[0063] 肝毒性可直接或间接地由酒精摄入引起,例如慢性饮酒。本文所述的肝毒性可直接或间接地由禁食、营养不良、感染物感染(例如肝炎病毒(例如甲、乙、丙、丁或戊型肝炎)、HIV)、癌症或药物相互作用引起。

[0064] 肝毒性可能与其他障碍、疾病和病症相关联。与肝毒性有关的障碍、疾病或病症包括急性肝损伤(ALI)、急性肝衰竭、急性肝病、慢性肝病、肝损害、肝炎(如病毒性肝炎、酒精性肝炎)、肝缺血再灌注损伤(IRI)(如“热”缺血再灌注(WIR))、放射性肝病(RILD)、药物性肝损伤(DILI)、自身免疫性肝损伤、胆汁淤积性肝病、HIV和癌症。

[0065] 药物性肝损伤包括内源性和异质性肝毒性,异质性DILI进一步包括过敏性和非过敏性反应。其内在机制与剂量依赖性肝毒性有关,而异质性肝毒性不是剂量依赖性的,可能以不可预测的方式发生。过敏性异质性肝毒性的进一步特征是出现典型的适应性免疫系统反应的症状和体征,包括发热、皮肤反应、嗜酸性粒细胞增多、自身抗体的形成,以及特别是在再次暴露后的短暂潜伏期(Khoury等人,J Clin Transl Hepatol.2015年6月28日;3(2):99-108)。

[0066] 本发明的各方面涉及对乙酰氨基酚(APAP)诱导的肝毒性的诊断、治疗和预防。对乙酰氨基酚也被称为N-乙酰基-对氨基苯酚或扑热息痛,或商标名称泰诺(Tylenol)和必理痛(Panadol)。对乙酰氨基酚中毒导致肝毒性,与肝细胞渗漏酶如天门冬氨酸转氨酶、乳酸脱氢酶和丙氨酸转氨酶的血清浓度增加、小叶中心变性和坏死以及库普弗细胞(Kupffer cells)激活有关(Trepicchio WL等人,Toxicol Pathol.2001;29(2):242-9)。

[0067] 能抑制IL-11作用的药剂

[0068] 本发明的各方面涉及抑制IL-11介导的信号传导。

[0069] 在此,“抑制”是指相对于对照条件的减少、降低或减轻。例如,通过能够抑制IL-11介导的信号传导的药物抑制IL-11作用是指在不存在该药剂时和/或在适当的对照药剂存在时减少、降低或减轻IL-11介导的信号传导的范围/程度。

[0070] 抑制在此也可称为中和或拮抗。也就是说,能够抑制IL-11介导的信号传导(例如由IL-11或含IL-11的复合物介导的相互作用、信号传导或其他活性)的药剂可以说是关于相关功能或过程的“中和”或“拮抗”剂。例如,能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂可以称为能够中和IL-11介导的信号传导的药剂,或者可以称为IL-11介导的信号传导的拮抗剂。

[0071] IL-11信号传导通路为抑制IL-11信号传导提供了多种途径。能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂可以这样做,例如通过抑制一种或多种参与或必需通过IL-11受体进行信号传导的因子的作用。

[0072] 例如,可以通过破坏IL-11(或含IL-11的复合物,例如IL-11和IL-11Rα的复合物)与IL-11受体(例如IL-11Rα、包含IL-11Rα或gp130的受体复合物或包含IL-11R和gp130的受体复合物)之间的相互作用来实现对IL-11信号传导的抑制。在一些实施方式中,通过抑制例如IL-11、IL-11Rα和gp130中的一种或多种的基因或蛋白质表达来实现对IL-11介导的信号传导的抑制。

[0073] 在实施方式中,IL-11介导的信号传导的抑制是通过干扰IL-11介导的顺式信号传导但不干扰IL-11介导的反式信号传导来实现的,例如,抑制IL-11介导的信号传导是通过抑制gp130介导的涉及膜结合IL-11Rα的顺式复合物来实现的。在实施方式中,IL-11介导的信号传导的抑制是通过干扰IL-11介导的反式信号传导而不干扰IL-11介导的顺式信号传导来实现的,即IL-11介导的信号传导的抑制是通过抑制gp130介导的反式信号传导复合物,如IL-11与可溶性IL-11Rα结合或IL-6与可溶性IL-6R结合来实现的。在实施方式中,通过干扰IL-11介导的顺式信号传导和IL-11介导反式信号传导来实现对IL-11介导的信号传导的抑制。本文所述的任何试剂可用于抑制IL-11介导的顺式和/或反式信号传导。在优选的实施方式中,通过干扰IL-11介导的顺式信号传导来实现对IL-11介导的信号传导的抑制。

[0074] 在其他实施例中,抑制IL-11信号传导可以通过干扰IL-11/IL-11Rα/gp130下游的信号传导通路来实现。即,在一些实施方式中,抑制/拮抗IL-11介导的信号传导包括抑制通过IL-11/IL-11受体复合物的信号传导下游的信号传导通路/过程/因子。

[0075] 在一些实施方式中,抑制/拮抗IL-11介导的信号转导包括抑制通过由IL-11/IL-11受体复合物激活的细胞内信号传导通路的信号传导。在一些实施方式中,抑制/拮抗IL-11介导的信号传导包括抑制一个或多个因子,其表达/活性由于通过IL-11/IL-11受体复合物信号传导而提高。

[0076] 在一些实施方式中,本发明的方法使用能够抑制JAK/STAT信号传导的药剂。在一些实施方式中,能够抑制JAK/STAT信号的药剂能够抑制JAK1、JAK2、JAK3、TYK2、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B和/或STAT6的作用。例如,药剂可以能够抑制JAK/STAT蛋白的激活,抑制JAK或STAT蛋白与细胞表面受体例如IL-11Rα或gp130的相互作用,抑制JAK蛋白的磷酸化,抑制JAK和STAT蛋白之间的相互作用,抑制STAT蛋白的磷酸化,抑制STAT蛋白的二聚化,抑制STAT蛋白向细胞核的易位,抑制STAT蛋白与DNA的结合,和/或促进JAK

和/或STAT蛋白的降解。在一些实施方式中,JAK/STAT抑制剂选自鲁索替尼(Ruxolitinib)(捷恪卫(Jakafi/Jakavi);因赛特公司)、托法替尼(Tofacitinib)(Xeljanz/Jakvinus;NIH/辉瑞公司)、奥拉替尼(Oclacitinib)(爱波可(Apoquel))、巴瑞克替尼(Baricitinib)(巴里替尼(Olumiant);因赛特/礼来公司),非戈替尼(G-146034/GLPG-0634;Galapagos NV公司),盐酸巴多昔芬(Gandotinib)(LY-2784544;礼来公司)、来妥替尼(Lestaurtinib)(CEP-701;梯瓦制药)、墨膜乐替尼(Momelotinib)(GS-0387/CYT-387;吉利德科学),帕瑞替尼(Pacritinib)(SB1518;CTI),PF-04965842(辉瑞公司),乌帕替尼(Upadacitinib)(ABT-494;艾伯维公司)、佩非西替尼(Peficitinib)(ASP015K/JNJ-54781532;安斯泰来制药)、菲达替尼(Fedratinib)(SAR302503;塞尔基因)、葫芦素I(JSI-124)和CHZ868。

[0077] 在一些实施方式中,本发明的方法使用能够抑制MAPK/ERK信号传导的药剂。在一些实施方式中,能够抑制MAPK/ERK信号传导的药物能够抑制GRB2的作用、抑制RAF激酶的作用、抑制MEK蛋白的作用、抑制MAP3K/MAP2K/MAPK和/或Myc的激活、和/或抑制STAT蛋白的磷酸化。在一些实施方式中,能够抑制ERK信号传导的药剂能够抑制ERK P42/44。在一些实施方式中,ERK抑制剂选自SCH772984、SC1、VX-11e、DEL-22379、索拉非尼(Sorafenib)(多吉美(Nexavar);拜耳/Onyx)、SB590885、PLX4720、XL281、RAF265(诺华公司)、康奈非尼(encorafenib)(LGX818/Braftovi;Array BioPharma)、达拉非尼(dabrafenib)(Tafinlar;GSK)、维莫非尼(vemurafenib)(Zelboraf;罗氏)、考比替尼(cobimetinib)(Cotellic;罗氏)、CI-1040、PD0325901、比美替尼(Binimetinib)(MEK162/Mektovi;Array BioPharma)、司美替尼(selumetinib)(AZD6244;Array/阿斯利康)和曲美替尼(Trametinib)(GSK1120212/Mekinist;诺华公司)。在一些实施方式中,本发明的方法使用能够抑制c-Jun N-末端激酶(JNK)信号/活性的药剂。在一些实施方式中,能够抑制JNK信号/活性的药剂能够抑制JNK(例如JNK1、JNK2)的作用和/或磷酸化。在一些实施方式中,JNK抑制剂选自SP600125、CEP 1347、TCS JNK6o、c-JUN肽、SU3327、AEG 3482、TCS JNK5a、BI78D3、IQ3、SR3576、IQ1S、JIP-1(153-163)和CC401二盐酸盐。

[0078] 在本实施例中,发明人证明NOX4的表达和活性通过IL-11/IL-11Rα/gp130信号转导而上调。NOX4是一种NADPH氧化酶,是活性氧(ROS)的来源。在肝细胞特异性I111表达的转基因小鼠中Nox4的表达上调,而IL11刺激的原代人肝细胞上调NOX4的表达。

[0079] 在一些实施方式中,本发明使用能够抑制NOX4表达(基因或蛋白质表达)或功能的药剂。在一些实施方式中,本发明使用能够抑制IL-11介导的NOX4表达/功能上调的药物。能够抑制NOX4表达或功能的药剂在此可称为NOX4抑制剂。例如,NOX4抑制剂能够降低NOX4的表达(例如基因和/或蛋白质表达),降低编码NOX4的RNA水平,降低NOX4蛋白水平,和/或降低NOX4活性水平(例如降低NOX4介导的NADPH氧化酶活性和/或NOX4介导的ROS产生)。

[0080] NOX4抑制剂包括NOX4结合分子和能够降低NOX4表达的分子。NOX4结合抑制剂包括肽/核酸适体、抗体(和抗体片段)和作为NOX4功能拮抗剂的NOX4相互作用伴侣的片段以及NOX4的小分子抑制剂。能够降低NOX4表达的分子包括NOX4的反义RNA(如siRNA,shRNA)。在一些实施方式中,NOX4抑制剂选自Altenhofer等人,Antioxid Redox Signal.(2015)23(5):406-427或Augsburder等人,Redox Biol.(2019)26:101272中描述的NOX4抑制剂,如GKT137831。

[0081] 结合剂

[0082] 在一些实施方式中,能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂可以与IL-11结合。在一些实施方式中,能够抑制IL-11介导的信号转导的药剂可结合IL-11受体(例如,IL-11Rα、gp130,或含有IL-11Rα和/或gp130的复合物)。这些药剂的结合可通过降低/阻止IL-11与IL-11受体结合的能力来抑制IL-11介导的信号传导,从而抑制下游信号传导。这些药剂的结合可能抑制IL-11介导的通过降低/阻止IL-11与IL-11受体(如IL-11Rα和/或gp130)结合的能力,来抑制顺式和/或反式信号传导,从而抑制下游的信号传递。药剂可以结合到反式信号传导复合物,如IL-11和可溶性IL-11Rα,并抑制gp130介导的信号传导。

[0083] 能够结合IL-11/含IL-11复合物或IL-11受体的药剂可以是任何种类,但在一些实施方式中,所述试药剂可以是抗体、其抗原结合片段、多肽、肽、核酸、寡核苷酸、适体或小分子。所述药剂可以以分离或纯化的形式提供,或者可以配制为药物组合物或药物。

[0084] 抗体和抗原结合片段

[0085] 在一些实施方式中,能够结合IL-11/含IL-11复合物或IL-11受体的药剂是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,能够结合IL-11/含IL-11复合物或IL-11受体的药剂是多肽,例如诱饵受体分子。在一些实施方式中,能够结合IL-11/含IL-11复合物或IL-11受体的药剂可以是适体。

[0086] 在一些实施方式中,能够结合IL-11/含IL-11复合物或IL-11受体的药剂是抗体或其抗原结合片段。“抗体”在本文中以最广泛的意义使用,并且包括单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)以及抗体片段,只要它们显示与相关靶分子结合。

[0087] 鉴于当今与单克隆抗体技术有关的技术,可以制备针对大多数抗原的抗体。抗原结合部分可以是抗体(例如Fab片段)或合成抗体片段(例如单链Fv片段[ScFv])的一部分。可以通过已知技术制备针对所选抗原的单克隆抗体,例如在《单克隆抗体:技术手册》,H Zola(CRC出版社,1988年)和《单克隆杂交瘤抗体:技术和应用》,J G RHurrell(CRC出版社,1982年)中所述。嵌合抗体由Neuberger等人(1988,第8届国际生物技术研讨会第2部分,792-799)讨论。单克隆抗体(mAb)在本发明的方法,并且是特异性靶向抗原上单个表位的同质抗体群中特别有用。

[0088] 多克隆抗体在本发明的方法中也是有用的。单特异性多克隆抗体是优选的。可以使用本领域所熟知的方法来制备合适的多克隆抗体。

[0089] 抗体的抗原结合片段,如Fab和Fab2片段,也可以被使用/提供作为可基因工程化的抗体和抗体片段。抗体的可变重(VH)和可变轻(VL)结构域参与抗原识别,这是早期蛋白酶消化实验首次认识到的事实。通过啮齿动物抗体的“人源化”进行了进一步的证实。啮齿动物来源的可变结构域可以与人源的恒定结构域融合,使得所得抗体保留啮齿动物亲本抗体的抗原特异性(Morrison等人(1984)Proc.Natl.Acad.Sd.USA 81,6851-6855)。

[0090] 根据本发明的抗体和抗原结合片段包括能够结合相关靶分子(即IL-11/含IL-11的复合物/IL-11受体)的抗体的互补决定区(CDR)。

[0091] 能够结合IL-11的抗体包括例如单克隆小鼠抗人IL-11抗体克隆#22626;目录号MAB218(R&D系统,美国明尼苏达州),例如在Bockhorn等人,Nat.Commun.(2013)4(0):1393中使用、克隆6D9A(Abbiotec)、克隆KT8(Abbiotec)、克隆M3103F11(BioLegend)、克隆1F1(亚诺法生技股份有限公司)、克隆3C6(亚诺法生技股份有限公司)、克隆GF1(LifeSpan

Biosciences)、克隆13455(Source BioScience)、11H3/19.6.1(Hermann等人,Arthritis Rheum.(1998)41(8):1388-97)、AB-218-NA(R&D系统)、X203(Ng等人,Sci Transl Med.(2019)11(511)pii:eaaw1237)和在US 2009/0202533 A1、WO 99/59608 A2和WO 2018/109174 A2中公开的抗IL-11抗体。

[0092] 特别地,抗IL-11抗体克隆22626(也称为MAB218)已被证明是IL-11介导的信号传导的拮抗剂,例如在Schaefer等人,自然(2017)552(7683):110-115中。单克隆抗体11H3/19.6.1在Hermann等人,关节炎与风湿病学(1998)41(8):1388-97被公开为一种中和抗IL-11IgG1。来自R&D系统的AB-218-NA,例如在McCoy等人,BMC癌症(2013)13:16中使用,是中和抗IL-11抗体的另一个例子。WO 2018/109174A2公开了IL-11介导的信号传导的又一示例性抗IL-11抗体拮抗剂。

[0093] 能够与IL-11Rα结合的抗体包括例如单克隆抗体克隆025(Sino Biologic)、克隆EPR5446(Abcam)、克隆473143(R&D Systems)、克隆8E2、8D10和8E4以及US 2014/0219919 A1中描述的亲和成熟的8E2的变体、Blanc等人(J.Immunol Methods.2000年7月31日;241(1-2);43-59)描述的单克隆抗体、X209(Widjaja等人,肠胃病学(2019)157(3):777-792)、在WO 2014121325 A1和US 2013/0302277 A1中公开的抗体、以及在US 2009/0202533 A1、WO 99/59608 A2和WO 2018/109170 A2中公开的抗IL-11Rα抗体。

[0094] 特别地,抗IL-11Rα抗体克隆473143(也称为MAB1977)已被证明是IL-11介导的信号传导的拮抗剂,例如在Schaefer等人,Nature(2017)552(7683):110-115中。US 2014/0219919 A1提供了抗人IL-11Rα抗体克隆8E2、8D10和8E4的序列,并公开了它们拮抗IL-11介导的信号传导的能力-参见例如US 2014/0219919 A1的[0489]至[0490]。此外,US 2014/0219919 A1还提供了克隆8E2的另外62个亲和成熟变体的序列信息,其中61个被公开拮抗IL-11介导的信号传导-参见US 2014/0219919 A1的表3。WO 2018/109170 A2公开了IL-11介导的信号传导的又一示例性抗IL-11Rα抗体拮抗剂。

[0095] 本领域技术人员清楚地知道用于生产适合在给定物种/对象治疗中使用的抗体的技术。例如,在Park和Smolen,Advances in Protein Chemication(2001)56:369-421中描述了生产适合于人类治疗用途的抗体的方法(其通过引用整体并入本文)。

[0096] 针对给定目标蛋白(例如IL-11或IL-11Rα)的抗体可以在模型物种(例如啮齿动物、兔类动物)中产生,并随后进行工程化改造,以改善其在给定物种/受试者中用于治疗的适用性。例如,通过免疫模型物种而产生的单克隆抗体的一个或多个氨基酸可以被替换,以得到与人种系免疫球蛋白序列更相似的抗体序列(从而降低用抗体治疗的人受试者中抗异种抗体免疫应答的可能性)。抗体可变结构域的修饰可以集中在框架区域,以保留抗体结合部位。抗体人源化是抗体技术领域的常规实践问题,如在Almagro和Fransson,生物科学前沿(2008)13:1619-1633,Safdari等人,生物技术与通用工程综述(2013)29(2):175-186,和Lo等人,微生物谱(2014)2(1)中综述,所有这些通过引用整体并入本文。通过在表达人免疫球蛋白基因的转基因模型物种中生产针对给定目标蛋白(例如IL-11或IL-11Rα)的抗体,可以规避人源化的要求,使得在这样的动物中生产的抗体是全人的(例如在Brüggemann等人,Arch Immunol Ther Exp(Warsz)(2015)63(2):101-108中所述,其通过引用整体并入本文)。

[0097] 噬菌体展示技术也可用于鉴定针对给定目标蛋白(例如IL-11或IL-11Rα)的抗体,

这是本领域技术人员所熟知的。例如在Hoogenboom,Nat.Biotechnol.(2005)23,1105-1116和Chan等人,International Immunology(2014)26(12):649-657中综述了噬菌体展示在鉴定针对人靶蛋白的全人抗体的应用,其通过引用整体并入本文。

[0098] 所述抗体/片段可以是抑制或降低IL-11生物活性的拮抗剂抗体/片段。所述抗体/片段可以是中和IL-11生物学效应的中和抗体,例如其通过IL-11受体刺激生产性信号传导的能力。中和活性可以通过中和T11小鼠浆细胞瘤细胞系中IL-11诱导的增殖的能力来测定(Nordan,R.P.等人(1987)J.Immunol.139:813)。

[0099] IL-11或IL-11Rα结合抗体可被评估拮抗IL-11介导的信号传导的能力,例如使用US 2014/0219919 A1或Blanc等人,J.Immunol Methods.2000年7月31日;241(1-2);43-59所述的方法。简单地说,可以在体外评估IL-11和IL-11Rα结合抗体抑制来自适当的物种的表达IL-11Rα和gp130的Ba/F3细胞响应来自适当物种的IL-11的刺激增殖的能力。或者,可以通过评估αSMA表达在体外分析IL-11和IL-11Rα结合抗体对于用TGFβ1刺激成纤维细胞后抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转变的能力(如WO 2018/109174 A2(实施例6)和WO 2018/109170 A2(实施例6),Ng等人,Sci Transl Med.(2019)11(511)pii:eaaw1237和Widjaja等人,Gastroenterology(2019)157(3):777-792中所述)。

[0100] 抗体通常包含六个CDR;三个在轻链可变区(VL)中:LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3,以及三个在重链可变区(VH)中:HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3。六个CDR共同定义了抗体的互补位,它是抗体与靶分子结合的部分。定义抗体CDR有几种不同的惯例,例如Kabat等人在《具有免疫学意义的蛋白质序列》第5版,美国国立卫生研究院公共卫生服务,马里兰州贝塞斯达(1991),Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)中描述的惯例,以及VBASE2,如Retter等,Nucl.Natl.Acad.Sci.(2005)33(增刊1):D671-D674中所述。

[0101] 可以使用能够结合相关靶分子的单克隆抗体(mAb)序列设计和制备本发明的抗体和抗原结合片段。也可以使用/提供抗体的抗原结合区,例如单链可变片段(scFv)、Fab和Fab2片段。“抗原结合区”或“抗体结合片段”是能够与给定抗体特异的靶标结合的抗体的任何片段。

[0102] 在一些实施方式中,抗体/片段包括抗体的VL和VH区,该抗体能够结合IL-11、含IL-11的复合物或IL-11的受体。抗体的抗原结合区的VL和VH区共同构成Fv区。在一些实施方式中,抗体/片段包括或由能够结合IL-11、含IL-11复合物或IL-11受体的抗体的Fv区组成。Fv区可表达为单链,其中VH和VL区共价连接,例如通过柔性寡肽。因此,抗体/片段可以包含或由包含抗体的VL和VH区的scFv组成,所述抗体能够结合IL-11、含有IL-11的复合物或IL-11受体。

[0103] 抗体的抗原结合区的VL和轻链恒定(CL)区,以及VH区和重链恒定1(CH1)区共同构成Fab区。在一些实施方式中,抗体/片段包括或由能够结合IL-11、含IL-11复合物或IL-11受体的抗体的Fab区组成。

[0104] 在一些实施方式中,抗体/片段包括或由能够结合IL-11、含IL-11复合物或IL-11受体的全抗体组成。“全抗体”是指具有与免疫球蛋白(Ig)的结构基本相似的结构的抗体。例如,在Schroeder和Cavacini的J Allergy Clin Immunol.(2010)125(202):S41-S52中描述了不同种类的免疫球蛋白及其结构,其通过引用整体并入本文。G型免疫球蛋白(即IgG)是约150kDa的糖蛋白,包含两条重链和两条轻链。从N末端到C末端,重链包含VH,其后是包

含三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)的重链恒定区,类似地,轻链包含VL,其后是CL。根据重链,免疫球蛋白可以分为IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4),IgA(例如IgA1、IgA2),IgD,IgE或IgM。轻链可以是κ(kappa)或λ(lambda)。

[0105] Fab、Fv、ScFv和dAb抗体片段均可在大肠杆菌中表达或从大肠杆菌中分泌出来,因此可轻松生产大量所述片段。

[0106] 全抗体和F(ab')2片段是"二价"的。"二价"是指所述抗体和F(ab')2片段具有两个抗原结合位点。相反,Fab、Fv、ScFv和dAb片段是单价的,仅具有一个抗原结合位点。也可以使用本领域所熟知的噬菌体展示技术制备能够与IL-11、含IL-11复合物或IL-11受体结合的合成抗体。

[0107] 抗体可以经亲和力成熟的过程产生,其中与未修饰的亲本抗体相比,产生的修饰的抗体对抗原的亲和力有所改善。亲和成熟的抗体可以通过本领域已知的方法产生,例如Marks等人,Rio/Technology 10:779-783(1992);Barbas等人,Proc Nat.Acad.Sci.USA 91:3809-3813(1994);Schier等人,Gene 169:147-155(1995);Yelton等人,J.Immunol.155:1994-2004(1995);Jackson等人,J.Immunol.154(7):331 0-15 9(1995)和Hawkins等人,J.Mol.Biol.226:889-896(1992)。

[0108] 抗体/片段包括双特异性抗体,例如由两种不同抗体的两个不同片段组成,使得双特异性抗体结合两种类型的抗原。所述双特异性抗体包括本文所述的能够结合IL-11、含IL-11复合物或IL-11受体的抗体/片段。所述抗体可以包含对第二抗原具有亲和力的不同片段,所述第二抗原可以是任何所需的抗原。制备双特异性抗体的技术在本领域中是众所周知的,例如参见Mueller,D等人,(2010Biodrugs 24(2):89-98),Wozniak-Knopp G等人,(2010Protein Eng Des23(4):289-297)和Baeuerle,PA等人,(2009Cancer Res 69(12):4941-4944)。双特异性抗体和双特异性抗原结合片段可以以任何合适的形式提供,例如在Kontermann Mabs 2012,4(2):182-197中所述的那些形式,其通过引用整体并入本文。例如,双特异性抗体或双特异性抗原结合片段可以是双特异性抗体缀合物(例如IgG2、F(ab')2或CovX-体),双特异性IgG或IgG样分子(例如IgG、scFv4-Ig、IgG-scFv、scFv-IgG、DVD-Ig、IgG-sVD、sVD-IgG、1-IgG、mAb2或Tandemab常见LC),不对称双特异性IgG或IgG样分子(例如kih IgG、kih IgG常见LC、CrossMab、kih IgG-scFab、mAb-Fv、电荷对或SEED体),小双特异性抗体分子(例如双体(Db)、dsDb、DART、scDb、tandAbs、串联scFv(taFv)、串联dAb/VHH、三体、三头、Fab-scFv或F(ab')2-scFv2),双特异性Fc和CH3融合蛋白(例如taFv-Fc、Di-双体、scDb-CH3、scFv-Fc-scFv、HCAb-VHH、scFv-kih-Fc或scFv-kih-CH3)或双特异性融合蛋白(例如scFv2-白蛋白、scDb-白蛋白、taFv毒素、DNL-Fab3、DNL-Fab4-IgG、DNL-Fab4-IgG-细胞因子2)。具体参见Kontermann MAbs 2012,4(2):182-19的图2。

[0109] 产生双特异性抗体的方法包括抗体或抗体片段的化学交联,例如通过可还原的二硫键或不可还原的硫醚键,如Segal和Bast于2001在《双特异性抗体的生产》,免疫学最新方案14:Iv:2.13:2.13.1-2.13.16中所述,其通过引用整体并入本文。例如,N-琥珀酰亚胺基-3-(-2-吡啶基二硫代)-丙酸酯(SPDP)可用于化学交联,例如Fab片段经由铰链区SH-基团以产生二硫键连接的双特异性F(ab)2异二聚体。

[0110] 产生双特异性抗体的其他方法包括融合产生抗体的杂交瘤,例如,用聚乙二醇产生一个能够分泌双特异性抗体的方形细胞,如D.M.和Bast,B.J.于2001在《双特异性抗体的

生产》,免疫学最新方案14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16中所述。

[0111] 双特异性抗体和双特异性抗原结合分子也可以通过重组生产,例如通过从编码抗原结合分子的多肽的核酸构建体表达,例如《抗体工程:方法和方案》,第二版(Humana出版社,2012年),第40章:双特异性抗体的产生:双体和串联scFv(HornigandFärber-Schwarz),或法文,《如何制造双特异性抗体》,分子医学方法,2000;40:333-339。

[0112] 例如,编码两个抗原结合结构域的轻链和重链可变域的DNA构建体(即能够结合IL-11、含IL-11的复合物或IL-11的受体的抗原结合结构域的轻链和重链可变域,以及能够结合另一种靶蛋白的抗原结合结构域的轻链和重链可变域),并包括在抗原结合结构域之间编码合适的连接子或二聚结构域的序列,其可以通过分子克隆技术制备。可以通过在合适的宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞)中表达(例如体外)构建体来产生重组双特异性抗体,然后可以任选地纯化表达的重组双特异性抗体。

[0113] 诱饵受体

[0114] 能够结合IL-11或含IL-11复合物的肽或基于多肽的药剂可以基于IL-11受体,例如IL-11受体的IL-11结合片段。

[0115] 在一些实施方式中,所述结合剂可以包括IL-11Rα链的IL-11结合片段,并且可以优选地是可溶的和/或排除一个或多个或全部跨膜结构域。在一些实施方式中,所述结合剂可以包括gp130的IL-11结合片段,并且可以优选地是可溶的和/或排除一个或多个或全部跨膜结构域。这些分子可以被描述为诱饵受体。这些药剂的结合可能通过降低/阻止IL-11与IL-11受体(如IL-11Rα或gp130)结合的能力,来抑制顺式和/或反式信号传导,从而抑制下游的信号传递。

[0116] Curtis等人(Blood 1997年12月1日;90(11):4403-12)报道可溶性小鼠IL-11受体α链(sIL-11R)在表达跨膜IL-11R和gp130的细胞上测试时,能够拮抗IL-11的活性。他们提出,观察到的sIL-11R对IL-11的拮抗作用依赖于已经表达跨膜IL-11R的细胞上限制性gp130分子的数量。

[0117] 使用可溶性诱饵受体作为抑制信号传导和治疗干预的基础也已报道用于其他信号分子:受体对,例如VEGF和VEGF受体(De-Chao Yu等人,Molecular Therapy(2012);20 5,938-947;Konner和Dupont Clin Colorectal Cancer,20040ct;4补充材料2:S81-5)。

[0118] 因此,在一些实施方式中,结合剂可以是诱饵受体,例如IL-11的可溶性受体和/或含IL-11的复合物。对由诱饵受体提供的IL-11和/或含IL-11复合物的竞争已被报道导致IL-11拮抗剂作用(Curtis等人,见上文)。诱饵IL-11受体也在WO 2017/103108 A1和WO 2018/109168 A1中描述,其通过引用整体并入本文。

[0119] 诱饵IL-11受体优选地结合IL-11和/或含IL-11的复合物,从而使这些物种不能与gp130、IL-11Rα和/或gp130:IL-11Rα受体结合。因此,它们作为IL-11和含IL-11复合物的“诱饵”受体,就像依那西普(etanercept)作为TNFα的诱饵受体一样。IL-11介导的信号传导与在没有诱饵受体时的信号传导水平相比降低。

[0120] 诱饵IL-11受体优选通过一个或多个细胞因子结合模块(CBMs)与IL-11结合。这些CBM是或来源于或同源于天然存在的IL-11受体分子的CBM。例如,诱饵IL-11受体可包括或由一个或多个来自、衍生于或与gp130和/或IL-11Rα的CBM同源的CBM组成。

[0121] 在一些实施方式中,诱饵IL-11受体可以包括或由对应于gp130的细胞因子结合模

块的氨基酸序列组成。在一些实施方式中,诱饵IL-11受体可包含对应于IL-11Rα的细胞因子结合模块的氨基酸序列。在此,与给定肽/多肽的参考区或序列“对应”的氨基酸序列与参考区/序列的氨基酸序列具有至少60%,例如至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之一的序列同一性。

[0122] 在一些实施方式中,诱饵受体可以能够结合IL-11,例如,结合亲和力至少为100μm或更小,任选为10μm或更小、1μm或更小、100nm或更小,或约1至100nm之一。在一些实施方式中,诱饵受体可以包括全部或部分IL-11结合域,并且可以任选地缺少全部或部分跨膜结构域。诱饵受体可任选地融合到免疫球蛋白恒定区,例如IgG Fc区。

[0123] 抑制剂

[0124] 本发明预期能够结合IL-11、含IL-11复合物、IL-11Rα、gp130或含IL-11Rα和/或gp130的复合物中的一种或多种并抑制IL-11介导的信号传导的抑制剂分子的用途。

[0125] 在一些实施方式中,所述药剂是基于IL-11的基于肽或多肽结合剂,例如IL-11的突变体、变体或结合片段。合适的基于肽或多肽的药物可以以不导致信号传导启动或产生次优信号传导的方式结合IL-11受体(例如IL-11Rα、gp130、或包含IL-11Rα和/或gp130的复合物)。这类IL-11突变体可以作为内源性IL-11的竞争性抑制剂。

[0126] 例如,W147A是一种IL-11拮抗剂,其中氨基酸147从色氨酸突变为丙氨酸,破坏了IL-11的所谓“位点III”。该突变体可以与IL-11Rα结合,但gp130同源二聚体的结合失败,导致IL-11信号传导的有效阻断(Underhill-Day等人,2003;Endocrinology 2003年8月;144(8):3406-14)。Lee等人(Am J respire Cell Mol Biol.2008年12月;39(6):739-746)还报道了一种IL-11拮抗剂突变体(一种“突变蛋白”)的产生,该突变体能够特异性地抑制IL-11与IL-11Rα的结合。IL-11突变蛋白也在WO 2009/052588 A1中描述。

[0127] Menkhorst等人(Biology of Reduction 2009年5月1日,Vol.80No.5 920-927)描述了一种聚乙二醇化的IL-11拮抗剂,PEGIL11A(澳大利亚,维多利亚州,帕克维尔,CSL有限公司)可有效抑制雌性小鼠中的IL-11作用。

[0128] Pasqualini等人,Cancer(2015)121(14):2411-2421描述了一种配体导向的拟肽药物,能够结合IL-11Rα的骨转移靶向肽多聚体-11(BMTP-11)。

[0129] 在一些实施方式中,能够与IL-11受体结合的结合剂可以IL-11Rα、gp130或含有IL-11Rα和/或gp130的复合物中的一种的小分子抑制剂的形式提供。在一些实施方式中,结合剂可以IL-11或含有IL-11的复合物的小分子抑制剂的形式提供,例如Lay等人,Int.J.Oncol.(2012);41(2):759-764中描述的IL-11抑制剂,其通过引用整体并入本文。

[0130] 适体

[0131] 在一些实施方式中,能够结合IL-11/含IL-11复合物或IL-11受体(例如,IL-11Rα、gp130,或含IL-11Rα和/或gp130的复合物)的药剂是适体。适体,也称为核酸/肽配体,是核酸或肽分子,其特征是与目标分子具有高特异性和高亲和力的结合能力。到目前为止,几乎所有的适体都是非天然存在的分子。

[0132] 给定靶标(例如,IL-11、含IL-11复合物或IL-11受体)的适体可以通过指数富集(SELEXTM)的配体系统进化的方法,或者通过开发SOMAmers(慢速修饰适体)(Gold L等人,(2010)PLoS ONE 5(12):e15004)来鉴定和/或生产。适体和SELEX在Tuerk和Gold,Science(1990)249(4968):505-10和WO 91/19813中有描述。应用SELEX和SOMAmer技术包括添加模

拟氨基酸侧链的官能团来扩大适体的化学多样性。因此,可以富集和鉴定针对靶标的高亲和力适体。

[0133] 适体可以是DNA或RNA分子,可以是单链或双链。适体可以包括化学修饰的核酸,例如其中糖和/或磷酸和/或碱基是化学修饰的。这种修饰可提高适体的稳定性或使适体更耐降解,并可包括在核糖的2′位处的修饰。

[0134] 适体可以通过本领域技术人员公知的方法合成。例如,适体可以化学合成,例如在固体载体上。固相合成可采用亚磷酰胺化学。简单地说,固体载体的核苷酸被脱氮,然后与适当活化的核苷亚磷酰胺偶联,形成亚磷酸三酯键。然后可以进行封盖,然后用氧化剂(通常是碘)氧化亚磷酸三酯。之后可以重复这个循环来组装适体(例如,参见Sinha,N.D.;Biernat,J.;McManus,J.;Köster,H.,Nuclear Acids Res.,1984,12,4539;和Beaucage,S.L.;Lyer,R.P.(1992).Tetrahedron48(12):2223)。

[0135] 合适的核酸适体可任选地具有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或40个核苷酸之一的最小长度。合适的核酸适体可任选地具有20、21、22、23、24、25、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或80个核苷酸之一的最大长度。合适的核酸适体可任选地具有10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、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、76、76、77、78、79或80个核苷酸之一的长度。

[0136] 适体可以是被选择或工程化改造以结合特定靶分子的肽。Reverdatto等人,Curr Top Med Chem.(2015)15(12):1082-101中综述了肽适体及其产生和鉴定方法,其通过引用整体并入本文。肽适体可任选地具有2,3,4,5,6,7,8,9或10个氨基酸之一的最小长度。肽适体可任选地具有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或50个氨基酸之一的最大长度。合适的肽适体可任选地具有2-30、2-25、2-20、5-30、5-25或5-20个氨基酸之一的长度。

[0137] 适体的K_D可以在nM或pM范围内,例如小于500nM、100nM、50nM、10nM、1nM、500pM、100pM之一。

[0138] IL-11结合剂的性质

[0139] 本发明的能够与IL-11/含IL-11复合物或IL-11受体结合的药剂可以表现出以下一个或多个性质:

[0140] • 与IL-11/含IL-11的复合物或IL-11受体特异性结合;

[0141] • 与IL-11/含IL-11的复合物或IL-11受体结合,其KD为10μm或更小,优选≤5μm、≤1μm、≤500nm、≤100nm、≤10nm、≤1nm或≤100pm之一;

[0142] • 抑制IL-11与IL-11Rα相互作用;

[0143] • 抑制IL-11与gp130相互作用;

[0144] • 抑制IL-11与IL-11Rα:gp130受体复合物相互作用;

[0145] • 抑制IL-11:IL-11Rα复合物与gp130相互作用。

[0146] 这些性质可以通过在适当的实验中对相关药剂进行分析来确定,这可能涉及将药

剂的性能与适当的对照药剂进行比较。本领域技术人员能够为给定的实验确定适当的控制条件。

[0147] 例如,用于分析测试抗体/抗原结合片段与IL-11/含IL-11的复合物/IL-11受体结合能力的合适阴性对照可以是针对非靶蛋白的抗体/抗原结合片段(即,对IL-11/含IL-11的复合物/IL-11受体非特异性的抗体/抗原结合片段)。合适的阳性对照可以是已知的、验证的(例如市售的)IL-11或IL-11受体结合抗体。对照可以是所分析的假定的IL-11/含IL-11的复合物/IL-11受体结合抗体/抗原结合片段的相同同种型,并且可以例如具有相同的恒定区域。

[0148] 在一些实施方式中,所述药剂可以能够特异性地结合IL-11或含有IL-11的复合物,或IL-11的受体(例如,IL-11Rα、gp130,或含有IL-11Rα和/或gp130的复合物)。特异性结合给定靶分子的药剂优选地以比其结合其它非靶分子更大的亲和力和/或更长的持续时间结合靶标。

[0149] 在一些实施方式中,所述药剂可以与IL-11或含IL-11的复合物结合,其亲和力大于与IL-6细胞因子家族的一个或多个其他成员(例如IL-6、白血病抑制因子(LIF)、抑瘤素M(OSM)、心肌营养素-1(CT-1)、睫状神经营养因子(CNTF)和心肌营养素样细胞因子(CLC))结合的亲和力。在一些实施方式中,所述药剂可以结合IL-11受体(例如IL-11Rα、gp130,或含有IL-11Rα和/或gp130)具有比结合IL-6受体家族的一个或多个其他成员的亲和力更大的亲和力。在一些实施方式中,所述药剂与IL-11Rα结合的亲和力大于与IL-6Rα、白血病抑制因子受体(LIFR)、抑瘤素M受体(OSMR)、睫状神经营养因子受体α(CNTFRα)和细胞因子受体样因子1(CRLF1)中的一种或多种结合的亲和力。

[0150] 在一些实施方式中,结合剂与非靶标的结合程度小于例如通过ELISA、SPR、生物层干涉法(BLI)、微尺度热泳(MST)或通过放射免疫分析(RIA)测量的所述药剂与靶标结合的约10%。或者,结合特异性可以反映在结合亲和力方面,其中结合剂与IL-11、含IL-11复合物或IL-11受体结合的K_D其至少比对其它非靶标分子的K_D大0.1个数量级(即0.1×10n,其中n是表示数量级的整数)。这可以任选地是至少0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5或2.0之一。

[0151] 对给定的结合剂对其靶标的结合亲和力通常用其解离常数(K_D)来描述。结合亲和力可以通过本领域已知的方法来测量,例如通过ELISA、表面等离子体共振(SPR;参见Hearty等人,Methods Mol Biol(2012)907:411-442;或者Rich等人,Anal Biochem.2008年2月1日;373(1):112-20)、生物层干涉法(参见例如Lad等人,(2015)J Biomol Screen 20(4):498-507;或Concepcion等人,Comb Chem High Throughput Screen.2009年9月;12(8):791-800),微尺度热泳(MST)分析(参见Jerabek-Willemsen等人,Assay Drug Dev Technol.2011年8月;9(4):342-353),或通过放射性标记抗原结合试验(RIA)。

[0152] 在一些实施方式中,所述试剂能够结合IL-11或含有IL-11的复合物,或IL-11的受体的K_D小于或等于50μm,优选地≤10μm、≤5μm、≤4μm、≤3μm、≤2μm、≤1μm、≤500nM、≤100nM、≤75nM、≤50nM、≤40nM、≤30nM、≤20nM、≤15nM、≤12.5nM、≤10nM、≤9nM、≤8nM、≤7nM、≤6nM、≤4nM、≤3nM、≤300pM、≤200pM或≤100pM之一。

[0153] 在一些实施方式中,所述试剂与IL-11、含IL-11复合物或IL-11受体结合的结合亲和力(例如通过ELISA测定)EC50=10,000ng/ml或更小,优选为≤5,000ng/ml、≤1000ng/

ml、≤900ng/ml、≤800ng/ml、≤600ng/ml、≤500ng/ml、≤400ng/ml、≤200ng/ml、≤100ng/ml、≤80ng/ml、≤40ng/ml、≤30ng/ml、≤15ng/ml、≤10ng/ml、≤7.5ng/ml、≤5ng/ml、≤2.5ng/ml、或≤1ng/ml之一。这样的ELISAs可以在例如《抗体工程》,卷1(第2版),施普林格方案,施普林格(2010),第五部分,第657-665页中所述的进行。

[0154] 在一些实施方式中,所述药剂在对结合IL-11或含IL-11复合物的受体(例如gp130或IL-11Rα)重要的区域中结合IL-11或含IL-11的复合物,从而抑制IL-11或含IL-11的复合物与IL-11受体之间的相互作用,和/或通过受体的信号传导。在一些实施方式中,所述药剂在对与IL-11或含IL-11复合物结合重要的区域中与IL-11受体结合,从而抑制IL-11或含IL-11复合物与IL-11受体之间的相互作用,和/或通过所述受体的信号传导。

[0155] 给定的结合剂(例如,能够结合IL-11/含IL-11复合物的试剂或IL-11受体)抑制两个蛋白质之间相互作用的能力可以通过例如在结合剂存在下或在结合剂与一个或两个相互作用伴侣孵育后的相互作用分析来确定。确定给定的结合剂是否能够抑制两个相互作用伴侣之间的相互作用的合适的测定的例子是竞争ELISA。

[0156] 一种能够抑制给定相互作用(例如IL-11和IL-11Rα之间,或IL-11和gp130之间,或IL-11和IL-11Rα:gp130之间,或IL-11和IL-11Rα:gp130之间,或IL-11:IL-11Rα和gp130之间)的结合剂,是通过观察与不存在结合剂时(或存在适当对照结合剂时)的相互作用水平相比,在存在结合剂的情况下或在一个或两个相互作用伴侣与结合剂孵育后相互作用伴侣之间相互作用水平的降低/减少来确定。合适的分析可以体外进行,例如使用重组相互作用伴侣或使用表达相互作用伴侣的细胞。表达相互作用伴侣的细胞可能是内源性的,也可能是通过引入细胞的核酸来表达的。为了这种测定的目的,可以标记一个或两个相互作用伴侣和/或结合剂或与可检测实体结合使用,以检测和/或测量相互作用的水平。例如,所述药剂可以用放射性原子或有色分子或荧光分子或易于以任何其他方式检测的分子标记。合适的可检测分子包括荧光蛋白、萤光素酶、酶底物和放射性标记。结合剂可以直接用可检测标记物标记,或者可以间接标记。例如,结合剂可以未标记,并由本身标记的另一结合剂检测。或者,第二结合剂可以已经与生物素结合,并且标记的链霉亲和素与生物素的结合被用于间接标记第一结合剂。

[0157] 结合剂抑制两个结合伴侣之间相互作用的能力也可以通过分析这种相互作用的下游功能结果来确定,例如IL-11介导的信号传导。例如,IL-11与IL-11Rα:gp130之间或IL-11:IL-11Rα与gp130之间相互作用的下游功能结果可包括例如由IL-11介导的过程,或例如胶原或IL-11的基因/蛋白表达。

[0158] IL-11或含IL-11复合物与IL-11受体之间相互作用的抑制可以使用3H-胸苷掺入和/或BA/F3细胞增殖测定,如Curtis等人,Blood,1997,90(11)和Karpovich等人,Mol.Hum.Reprod.,2003 9(2):75-80中所述的方法来分析。BA/F3细胞共表达IL-11Rα和gp130。

[0159] 在一些实施方式中,所述结合剂可将IL-11与IL-11Rα的相互作用抑制到在不存在结合剂(或存在适当的对照结合剂)时IL-11与IL-11Rα之间的相互作用水平的100%以下,例如,99%或以下、95%或以下、90%或以下、85%或以下、75%或以下、70%或以下、65%或以下、60%或以下、55%或以下、50%或以下、45%或以下、40%或以下、35%或以下、30%或以下、25%或以下、20%或以下、15%或以下、10%或以下、5%或以下或1%或以下之一。在

一些实施方式中,结合剂可以能够抑制IL-11和IL-11Rα之间的相互作用到不存在结合剂(或存在适当的对照结合剂)时IL-11和IL-11Rα之间的相互作用水平的小于1倍,例如≤0.99倍、≤0.95倍、≤0.9倍、≤0.85倍、≤0.8倍、≤0.75倍、≤0.7倍、≤0.65倍、≤0.6倍、≤0.55倍、≤0.5倍、≤0.45倍、≤0.4倍、≤0.35倍、≤0.3倍、≤0.25倍、≤0.2倍、≤0.15倍、≤0.1倍之一。

[0160] 在一些实施方式中,所述结合剂可将IL-11与gp130的相互作用抑制到在不存在结合剂(或存在适当的对照结合剂)时IL-11与gp130之间的相互作用水平的100%以下,例如,99%或以下、95%或以下、90%或以下、85%或以下、75%或以下、70%或以下、65%或以下、60%或以下、55%或以下、50%或以下、45%或以下、40%或以下、35%或以下、30%或以下、25%或以下、20%或以下、15%或以下、10%或以下、5%或以下或1%或以下之一。在一些实施方式中,结合剂可以能够抑制IL-11和gp130之间的相互作用到不存在结合剂(或存在适当的对照结合剂)时IL-11和gp130之间的相互作用水平的小于1倍,例如≤0.99倍、≤0.95倍、≤0.9倍、≤0.85倍、≤0.8倍、≤0.75倍、≤0.7倍、≤0.65倍、≤0.6倍、≤0.55倍、≤0.5倍、≤0.45倍、≤0.4倍、≤0.35倍、≤0.3倍、≤0.25倍、≤0.2倍、≤0.15倍、≤0.1倍之一。

[0161] 在一些实施方式中,所述结合剂可将IL-11与IL-11Rα:gp130的相互作用抑制到在不存在结合剂(或存在适当的对照结合剂)时IL-11与IL-11Rα:gp130之间的相互作用水平的100%以下,例如,99%或以下、95%或以下、90%或以下、85%或以下、75%或以下、70%或以下、65%或以下、60%或以下、55%或以下、50%或以下、45%或以下、40%或以下、35%或以下、30%或以下、25%或以下、20%或以下、15%或以下、10%或以下、5%或以下或1%或以下之一。在一些实施方式中,结合剂可以能够抑制IL-11和IL-11Rα:gp130之间的相互作用到不存在结合剂(或存在适当的对照结合剂)时IL-11和IL-11Rα:gp130之间的相互作用水平的小于1倍,例如≤0.99倍、≤0.95倍、≤0.9倍、≤0.85倍、≤0.8倍、≤0.75倍、≤0.7倍、≤0.65倍、≤0.6倍、≤0.55倍、≤0.5倍、≤0.45倍、≤0.4倍、≤0.35倍、≤0.3倍、≤0.25倍、≤0.2倍、≤0.15倍、≤0.1倍之一。

[0162] 在一些实施方式中,所述结合剂可将IL-11:IL-11Rα复合物与gp130的相互作用抑制到在不存在结合剂(或存在适当的对照结合剂)时IL-11:IL-11Rα与gp130之间的相互作用水平的100%以下,例如,99%或以下、95%或以下、90%或以下、85%或以下、75%或以下、70%或以下、65%或以下、60%或以下、55%或以下、50%或以下、45%或以下、40%或以下、35%或以下、30%或以下、25%或以下、20%或以下、15%或以下、10%或以下、5%或以下或1%或以下之一。在一些实施方式中,所述结合剂能够抑制IL-11:IL-11Rα复合物与gp130之间的相互作用至不存在结合剂(或存在适当的对照结合剂)时IL-11:IL-11Rα复合物与gp130之间的相互作用水平的小于1倍,例如≤0.99倍、≤0.95倍、≤0.9倍、≤0.85倍、≤0.8倍、≤0.75倍、≤0.7倍、≤0.65倍、≤0.6倍、≤0.55倍、≤0.5倍、≤0.45倍、≤0.4倍、≤0.35倍、≤0.3倍、≤0.25倍、≤0.2倍、≤0.15倍、≤0.1倍之一。

[0163] 能够减少IL-11或IL-11受体表达的药剂

[0164] 在本发明的各方面,能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂能够阻止或减少IL-11、IL-11Rα或gp130中的一个或多个的表达。

[0165] 表达可以是基因或蛋白质表达,并且可以如本文所述或通过本领域技术人员熟知的方法来确定。表达可以通过受试者的细胞/组织/器官/器官系统。

[0166] 合适的药剂可以是任何种类,但在一些实施方式中,能够阻止或减少IL-11、IL-11Rα或gp130中的一个或多个表达的药剂可以是小分子或寡核苷酸。

[0167] 一种能够阻止或减少IL-11、IL-11Rα或gp130中的一个或多个的表达的药剂,可以通过抑制编码IL-11、IL-11Rα或gp130基因的转录,抑制编码IL-11、IL-11Rα或gp130的RNA的转录后加工,降低编码IL-11、IL-11Rα或gp130的RNA的稳定性,促进编码IL-11、IL-11Rα或gp130的RNA的降解,抑制IL-11、IL-11Rα或gp130多肽的翻译后加工,降低IL-11、IL-11Rα或gp130多肽的稳定性或促进IL-11、IL-11Rα或gp130多肽的降解来发挥作用。

[0168] Taki等人,Clin Exp Immunol(1998)4月;112(1):133-138报道了类风湿滑膜细胞中IL-11的表达在吲哚美辛、地塞米松或干扰素γ(IFNγ)治疗后减少。

[0169] 本发明预期反义核酸用于阻止/减少IL-11、IL-11Rα或gp130的表达。在一些实施方式中,能够阻止或减少IL-11、IL-11Rα或gp130表达的药物可通过RNA干扰(RNAi)引起表达减少。

[0170] 在一些实施方式中,所述药剂可以是抑制性核酸,例如反义或小干扰RNA,包括但不限于shRNA或siRNA。

[0171] 在一些实施方式中,在载体中提供抑制性核酸。例如,在一些实施方式中,所述药剂可以是编码IL-11、IL-11Rα或gp130中一种或多种的shRNA的慢病毒载体。

[0172] 寡核苷酸分子,特别是RNA可以用来调节基因表达。这些包括反义寡核苷酸,小干扰RNA(siRNAs)对mRNA的靶向降解、转录后基因沉默(PTGs)、微RNA(miRNAs)对mRNA的发育调控序列特异性翻译抑制和靶向转录基因沉默。

[0173] 反义寡核苷酸是一种寡核苷酸,优选是单链的,它通过互补序列结合,靶向和结合目标寡核苷酸,例如mRNA。当目标寡核苷酸是mRNA时,反义与mRNA的结合阻断了mRNA的翻译和基因产物的表达。反义寡核苷酸可以被设计成结合有义基因组核酸并抑制目标核苷酸序列的转录。

[0174] 鉴于IL-11、IL-11Rα和gp130的已知核酸序列(例如,从GenBank获得的已知mRNA序列,登录号为:BC012506.1GI:15341754(人IL-11)、BC134354.1GI:126632002(小鼠IL-11)、AF347935.1GI:13549072(大鼠IL-11)、NM_001142784.2GI:391353394(人IL-11Rα)、NM_001163401.1GI:254281268(小鼠IL-11Rα)、NM_139116.1GI:20806172(大鼠IL-11Rα)、NM_001190981.1GI:300244534(人gp130)、NM_010560.3GI:225007624(小鼠gp130)、NM_001008725.3GI:300244570(大鼠gp130))寡核苷酸可以抑制或沉默IL-11、IL-11Rα或gp130的表达。

[0175] 这种寡核苷酸可以具有任何长度,但优选短的,例如小于100个核苷酸,例如10-40个核苷酸,或20-50个核苷酸,并且可以包括与靶寡核苷酸中相应长度的核苷酸序列,例如IL-11、IL-11Rα或gp130 mRNA具有完全或接近互补(例如80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%互补)的核苷酸序列。核苷酸序列的互补区可以具有任何长度,但优选至少5个,任选不超过50个核苷酸长,例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个核苷酸之一。

[0176] 抑制IL-11、IL-11Rα或gp130的表达将优选地导致细胞/组织/器官/器官系统/受试者表达的IL-11、IL-11Rα或gp130的数量减少。例如,在给定的细胞中,通过给予适当的核

酸抑制IL-11、IL-11Rα或gp130的表达,将导致该细胞相对于未处理的细胞表达的IL-11、IL-11Rα或gp130的数量减少。抑制可以是部分的。优选的抑制度为至少50%,更优选地至少60%、70%、80%、85%或90%中的一种。在90%到100%之间的抑制水平被认为是表达或功能的"沉默"。

[0177] RNAi机制和小RNA在特异性染色质复合物的靶向和特定染色体位点的表观遗传基因沉默中的作用已经被证明。依赖双链RNA(dsRNA)的转录后沉默,又称RNA干扰(RNAi),是指dsRNA复合物在短时间内靶向同源的特定基因进行沉默的现象。它作为一个信号,促进具有序列同一性的mRNA降解。一个20nt的siRNA通常足够长以诱导基因特异性沉默,但也足够短以逃避宿主反应。靶向基因产物表达的减少可以是广泛的,由少数siRNA分子诱导的沉默可达90%。以RNAi为基础的治疗已经进入I、II和III期临床试验,用于许多适应症(Nature,2009年1月22日;457(7228):426-433)。

[0178] 在本领域,这些RNA序列根据其来源被称为"短或小干扰RNA"(siRNA)或"microRNAs"(miRNA)。这两种类型的序列都可以通过与互补的RNA结合并触发mRNA消除(RNAi),或者阻止mRNA翻译成蛋白质来下调基因表达。siRNA是由长双链RNA加工而成,在自然界中被发现时,通常是外源性的。微干扰RNA(miRNA)是由短发夹加工而成的内源编码的非编码小RNA。siRNA和miRNA都能抑制含有部分互补靶序列的mRNA的翻译而不切割RNA,并降解含有完全互补序列的mRNA。

[0179] siRNA配体通常是双链的,并且为了优化RNA介导的靶基因功能下调的有效性,优选选择siRNA分子的长度以确保介导siRNA对mRNA靶的识别的RISC复合物对siRNA的正确识别,并且使得siRNA足够短以减少宿主反应。

[0180] miRNA配体通常是单链的,具有部分互补的区域,使配体形成发夹。miRNAs是从DNA转录而来,但不被翻译成蛋白质的RNA基因。编码miRNA基因的DNA序列比miRNA长。这个DNA序列包括miRNA序列和一个近似的反向补体。当这个DNA序列被转录成单链RNA分子时,miRNA序列与其反向互补碱基对形成部分双链RNA片段。在John等人,PLoS Biology,11(2),1862-1879,2004中讨论了microRNA序列的设计。

[0181] 通常,拟模拟siRNA或miRNA效应的RNA配体具有10-40个核糖核苷酸(或其合成类似物),更优选17-30个核糖核苷酸,更优选19-25个核糖核苷酸,最优选21-23个核糖核苷酸。在使用双链siRNA的本发明的一些实施方式中,所述分子可以具有对称的3'突出,例如一个或两个(核糖)核苷酸,通常是dTdT 3'突出的UU。基于这里提供的公开,本领域技术人员可以容易地设计合适的siRNA和miRNA序列,例如使用诸如Ambion siRNA finder的资源。siRNA和miRNA序列可以合成并外源添加以引起基因下调或使用表达系统(如载体)产生。在优选的实施方式中,所述siRNA是合成合成的。

[0182] 更长的双链RNA可以在细胞中加工以产生siRNA(例如,参见Myers(2003)Nature Biotechnology 21:324-328)。较长的dsRNA分子可能具有对称的3'或5'突出,例如一个或两个(核糖)核苷酸,或者可能具有平头末端。较长的dsRNA分子可能是25个核苷酸或更长。优选地,较长的dsRNA分子长度在25至30个核苷酸之间。更优选地,较长的dsRNA分子长度在25至27个核苷酸之间。最优选地,较长的dsRNA分子长度为27个核苷酸。长度为30个或更长的dsRNAs可以使用载体pDECAP表达(Shinagawa等人,Genes and Dev.,17,1340-5,2003)。

[0183] 另一种选择是在细胞中表达一个短发夹RNA分子(shRNA)。shRNA比合成的siRNA更

稳定。一个shRNA由短的反向重复序列组成,由一个小的环序列分开。一个反向重复基因靶标互补。在细胞中,shRNA被DICER处理成siRNA,它降解目的基因mRNA并抑制表达。在优选的实施方式中,shRNA是通过从载体转录而内源(在细胞内)产生的。在RNA聚合酶III启动子如人H1或7SK启动子或RNA聚合酶II启动子的控制下,通过用编码shRNA序列的载体转染细胞,可以在细胞内产生shRNA。或者,可以通过从载体转录外源合成shRNA(体外)。然后可以将shRNA直接引入细胞。优选地,所述shRNA分子包含IL-11、IL-11Rα或gp130的部分序列。优选地,所述shRNA序列的长度在40至100个碱基之间,更优选地在40至70个碱基之间。发夹的茎的长度优选在19至30个碱基对之间。茎可包含G-U配对以稳定发夹结构。

[0184] siRNA分子、较长的dsRNA分子或miRNA分子可以通过转录核酸序列进行重组,所述核酸序列优选包含在载体中。优选地,siRNA分子、较长的dsRNA分子或miRNA分子包含IL-11、IL-11Rα或gp130的部分序列。

[0185] 在一个实施方式中,siRNA、较长的dsRNA或miRNA是通过从载体转录而内源(在细胞内)产生的。可以以本领域中已知的任何方式将载体引入到细胞中。任选地,可以使用组织特异性(例如,心脏、肝脏或肾脏特异性)启动子来调节RNA序列的表达。在另一个实施方式中,siRNA、较长的dsRNA或miRNA是通过从载体转录外源产生的(体外)。

[0186] 合适的载体可以是配置为表达能够抑制IL-11、IL-11Rα或gp130的寡核苷酸药剂的寡核苷酸载体。这种载体可以是病毒载体或质粒载体。治疗性寡核苷酸可以整合在病毒载体的基因组中,并可操作地连接到驱动其表达的调节性序列,例如启动子。术语“可操作地连接”可以包括这样的情况,其中选定的核苷酸序列和调节性核苷酸序列共价连接,以使核苷酸序列的表达受到调节序列的影响或控制。因此,如果调控序列能够影响形成部分或全部选定的核苷酸序列的核苷酸序列的转录,则调节性序列可操作地连接到选定的核苷酸序列。

[0187] 编码启动子表达的siRNA序列的病毒载体是本领域中已知的,并且具有长期表达治疗性寡核苷酸的益处。实例包括慢病毒(Nature 2009年1月22日;457(7228):426-433),腺病毒(Shen等人,FEBS Lett 2003年3月27日;539(1-3)111-4)和逆转录病毒(Barton和Medzhitov PNAS 2002年11月12日第99卷,第23期,14943-14945)。

[0188] 在其他实施方式中,载体可被配置为协助将治疗性寡核苷酸递送到需要抑制IL-11、IL-11Rα或gp130表达的部位。这种载体通常包括将寡核苷酸与带正电荷的载体(例如,阳离子细胞穿透肽、阳离子聚合物和树状大分子以及阳离子脂质)络合;将所述寡核苷酸与小分子(例如,胆固醇、胆汁酸和脂质)、聚合物、抗体和RNA结合;或者将寡核苷酸封装在纳米粒制剂中(Wang等人,AAPS J.2010年12月;12(4):492-503)。

[0189] 在一个实施方式中,载体可以包括有义和反义方向的核酸序列,使得当表达为RNA时,有义和反义区段将结合以形成双链RNA。

[0190] 或者,可以使用本领域已知的标准固相或液相合成技术来合成siRNA分子。核苷酸之间的连接可以是磷酸二酯键或替代键,例如,式P(O)S,(硫酸盐)的连接基团;P(S)S,(二硫代);P(O)NR'2;P(O)R';P(O)OR6;CO;或CONR'2,其中R是H(或盐)或烷基(1-12C),并且R6是烷基(1-9C)通过-O-或-S-连接到相邻的核苷酸上。

[0191] 修饰的核苷酸碱基可用于天然存在的碱基之外,并可赋予含有它们的siRNA分子有利的性质。

[0192] 例如,修饰的碱基可以增加siRNA分子的稳定性,从而减少沉默所需的数量。修饰碱基的提供也可以提供比未修饰的siRNA更稳定或更不稳定的siRNA分子。

[0193] 术语“修饰的核苷酸碱基”包括带有共价修饰的碱基和/或糖的核苷酸。例如,修饰的核苷酸包括具有与低分子量有机基团共价连接的糖的核苷酸,所述低分子量有机基团不是在3’位置的羟基和不是在5’位置的磷酸基团。因此,修饰的核苷酸还可以包括2’取代的糖,如2’-O-甲基-;2’-O-烷基;2’-O-烯丙基;2’-S-烷基;2’-S-烯丙基;2′-氟-;2’-卤代或叠氮-核糖,碳环糖类似物,a-异形糖;异构体糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖和景天庚酮糖。

[0194] 修饰的核苷酸是本领域已知的,包括烷基化嘌呤和嘧啶、酰化嘌呤和嘧啶以及其他杂环。这些种类的嘧啶和嘌呤是本领域中已知的,包括假异胞嘧啶、N4,N4-乙胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧羟甲基)尿嘧啶、5氟尿嘧啶、5-溴嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫氧嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫氧嘧啶、-D-甘露糖基奎苷、5-甲氧羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、假尿嘧啶、2-硫代嘧啶、5-甲基-2硫代嘧啶、2-硫代嘧啶、4-硫代嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧代乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧代乙酸、奎苷(queosine)、2-硫代嘧啶、5-丙基尿嘧啶、5-丙基胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶、5-丁基尿嘧啶、5-戊基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、甲基硫代嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基胞嘧啶。

[0195] 使用RNAi使秀丽线虫(C.elegans)、果蝇、植物和哺乳动物中的基因沉默的方法是本领域已知的(Fire A等人,1998Nature 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.等人,Nature Rev.Genet.2,110-1119(2001);Tuschl,T.Chem.Biochem.2,239-245(2001);Hamilton,A.等人,Science286,950-952(1999);Hammond,S.M.等人,Nature 404,293-296(2000);Zamore,P.D.等人,Cell 101,25-33(2000);Bernstein,E.等人,Nature 409,363-366(2001);Elbashir,S.M.等人,Genes Dev.15,188-200(2001);WO0129058;WO9932619和Elbashir S M等人,2001Nature 411:494-498)。

[0196] 因此,本发明提供了核酸,当适当地导入或在哺乳动物(例如人)的细胞内表达时,所述细胞除此之外表达IL-11、IL-11Rα或gp130,该核酸能够通过RNAi抑制IL-11、IL-11Rα或gp130的表达。

[0197] IL-11、IL-11Rα和gp130寡核苷酸的核酸序列(例如,从GenBank获得的已知mRNA序列,登录号为:BC012506.1GI:15341754(人IL-11)、BC134354.1GI:126632002(小鼠IL-11)、AF347935.1GI:13549072(大鼠IL-11)、NM_001142784.2GI:391353394(人IL-11Rα)、NM_001163401.1GI:254281268(小鼠IL-11Rα)、NM_139116.1GI:20806172(大鼠IL-11Rα)、NM_001190981.1GI:300244534(人gp130)、NM_010560.3GI:225007624(小鼠gp130)、NM_001008725.3GI:300244570(大鼠gp130))可以抑制或沉默IL-11、IL-11Rα或gp130的表达。

[0198] 所述核酸可与IL-11、IL-11Rα或gp130 mRNA的一部分具有实质的序列同一性,例如,如GenBank登录号:NM_000641.3GI:391353405(IL-11)、NM_001142784.2GI:391353394(IL-11Rα)、NM_001190981.1GI:300244534(gp130)中定义的或上述mRNA的互补序列。

[0199] 核酸可以是双链siRNA。(如本领域技术人员将理解的,并且如下文进一步解释的,siRNA分子也可以包括短的3'DNA序列。)

[0200] 或者,所述核酸可以是DNA(通常是双链DNA),当在哺乳动物细胞中转录时,其产生具有通过间隔区连接的两个互补部分的RNA,使得当互补部分彼此杂交时,RNA采取发夹的形式。在哺乳动物细胞中,发夹结构可以被DICER酶切割从分子中分裂出来,产生两个不同但杂交的RNA分子。

[0201] 在一些优选的实施方式中,所述核酸通常靶向SEQ ID NO:4至7(IL-11)之一的序列或SEQ ID NO:8至11(IL-11Rα)之一的序列。

[0202] 只有mRNA转录本的单链(即非自体杂交)区域才有望成为RNAi的合适靶点。因此,在IL-11或IL-11RαmRNA转录本中与SEQ ID NO:4～7或8～11所代表的序列非常接近的其他序列也可能是适合的RNAi靶点。这些靶序列的长度优选为17-23个核苷酸,并且优选与SEQ ID NO:4至7或8至11中的一个重叠至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或全部19个核苷酸(在SEQ ID NO:4至7或8至11中的一个的任一端)。

[0203] 因此,本发明提供了当适当地导入或在以其他方式表达IL-11或IL-11Rα的哺乳动物细胞中表达时,能够通过RNAi抑制IL-11或IL-11Rα的表达的核酸,其中所述核酸一般靶向SEQ ID NO:4至7或8至11中的一个序列。

[0204] 通过“一般靶向”,核酸可以靶向与SEQ ID NO:4至7或8至11重叠的序列。特别地,所述核酸可以靶向人IL-11或IL-11Rα的mRNA中的序列,该序列比SEQ ID NO:4至7或8至11之一稍长或稍短(优选长度为17至23个核苷酸),但在其他方面与SEQ ID NO:4至7或8至11之一相同。

[0205] 期望本发明的核酸和靶序列之间的完全同一性/互补性,尽管是优选的,但并不是必需的。因此,与IL-11或IL-11Rα的mRNA相比,本发明的核酸可以包括单个错配。然而,即使是单个错配的存在也可能导致效率降低,因此优选不存在错配。当存在时,3'突出可以从错配数量的考虑中排除。

[0206] 术语“互补性”不限于由天然核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸组成的核酸之间的常规碱基配对,还包括mRNA和包括非天然核苷酸的本发明核酸之间的碱基配对。

[0207] 在一个实施方式中,所述核酸(这里称为双链siRNA)包括SEQ ID NO:12至15所示的双链RNA序列。在另一个实施方式中,所述核酸(这里称为双链siRNA)包括SEQ ID NO:16至19所示的双链RNA序列。

[0208] 然而,也预计针对IL-11或IL-11RαmRNA相同区域的稍短或稍长的序列也会有效。特别是,预计长度在17至23bp之间的双链序列也将是有效的。

[0209] 形成双链RNA的链可能有短的3'二核苷酸突出,其可以是DNA或RNA。与3'RNA突出相比,使用3'DNA突出对siRNA活性没有影响,但降低了核酸链化学合成的成本(Elbashir等人,2001c)。因此,DNA二核苷酸可以是优选的。

[0210] 当存在时,二核苷酸突出可以彼此对称,尽管这不是必要的。事实上,有义(上游)链的3'突出与RNAi活性无关,因为它不参与mRNA的识别和降解(Elbashir等人,2001a,2001b,2001c)。

[0211] 而果蝇的RNAi实验表明,反义3'突出可能参与了mRNA的识别和靶向(Elbashir等人,2001c),3'突出似乎不是哺乳动物细胞中siRNA的RNAi活性所必需的。因此,不正确的3'

突出退火被认为对哺乳动物细胞没有什么影响(Elbashir等人,2001c;Czauderna等人,2003)。

[0212] 因此,任何突出的二核苷酸都可以用于siRNA的反义链。然而,所述二核苷酸优选为-UU或-UG(如果突出是DNA,则为-TT或-TG),更优选为-UU(或-TT)。-UU(或-TT)二核苷酸突出是最有效的,与RNA聚合酶III转录信号末端一致(即能够形成部分)(终止信号是TTTTT)。因此,所述二核苷酸是最优选的。二核苷酸AA、CC和GG也可以使用,但效果较差,因此较不优选。

[0213] 此外,3'突出可以从siRNA中完全删除。

[0214] 本发明还提供单链核酸(在此称为单链siRNAs),分别由上述双链核酸之一的组成链组成,优选具有3'-突出,但任选地不具有。本发明还提供了包含这种单链核酸对的试剂盒,它们能够在体外相互杂交形成上述双链siRNA,然后将其引入细胞。

[0215] 本发明还提供DNA,当在哺乳动物细胞中转录时,其产生具有两个互补部分的RNA(这里也称为shRNA),这两个互补部分能够自体杂交以产生双链基序,例如包括选自下组的序列:SEQ ID NO:12至15或16至19或与上述任何一个序列不同的单碱基对取代的序列。

[0216] 互补部分通常由间隔区连接,间隔区具有适当的长度和序列以允许两个互补部分彼此杂交。这两个互补部分(即有义和反义)可以以5'-3'的顺序连接在一起。间隔区通常是短序列,大约4-12个核苷酸,优选4-9个核苷酸,更优选6-9个核苷酸。

[0217] 优选地,间隔区的5'端(紧邻上游互补部分的3'端)由核苷酸-UU-或-UG-,同样优选-UU-组成(然而,同样地,这些特定的二核苷酸的使用并不是必需的)。推荐在OligoEngine(美国华盛顿州西雅图)的pSuper系统中使用的一个合适的间隔区是UUCAAGAGA。在这种和其他情况下,间隔区的末端可以彼此杂交,例如,将双链基序延伸到SEQ ID NO:12至15或16至19的确切序列之外少量(例如1或2)碱基对。

[0218] 类似地,转录的RNA优选包括来自下游互补部分的3'突出。同样,这优选为-UU或-UG,更优选为-UU。

[0219] 然后,这种shRNA分子可以在哺乳动物细胞中被酶DICER切割以产生如上所述的双链siRNA,其中杂交的dsRNA的一条或每条链包括3'突出。

[0220] 本发明核酸的合成技术在本领域中当然是众所周知的。

[0221] 本领域技术人员能够使用公知的技术和市售材料为本发明的DNA构建合适的转录载体。特别地,所述DNA将与控制序列相关联,包括启动子和转录终止序列。

[0222] 特别适合的是OligoEngine的商用pSuper和pSuperior系统(美国华盛顿州西雅图)。这些使用聚合酶III启动子(H1)和T5转录终止子序列,该序列在转录物的3'末端贡献两个U残基(在DICER处理后,提供siRNA的一条链的3'UU突出)。

[0223] 另一个合适的系统在Shin等人(RNA,2009年5月;15(5):898-910)中描述,它使用另一个聚合酶-III启动子(U6)。

[0224] 本发明的双链siRNA可使用已知的技术在体外或在体内导入哺乳动物细胞,如下所述,来抑制IL-11或IL-11受体的表达。

[0225] 类似地,可以使用已知的技术将含有本发明的DNA的转录载体在体外或在体内导入肿瘤细胞,如下所述,用于RNA的瞬时或稳定表达,再次抑制IL-11或IL-11受体的表达。

[0226] 因此,本发明还提供了一种抑制哺乳动物(例如人)细胞中IL-11或IL-11受体表达

的方法,所述方法包括向该细胞施用本发明的双链siRNA或本发明的转录载体。

[0227] 类似地,本发明还提供一种治疗肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用本发明的双链siRNA或本发明的转录载体。

[0228] 本发明还提供本发明的双链siRNA和本发明的转录载体,用于治疗方法,优选治疗肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法。

[0229] 本发明还提供了本发明的双链siRNA和本发明的转录载体在制备治疗肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的药物中的用途。

[0230] 本发明还提供一种组合物,其包含本发明的双链siRNA或本发明的转录载体与一种或多种药学上可接受的载体混合。合适的载体包括亲脂性载体或囊泡,它们可能有助于细胞膜的穿透。

[0231] 适用于本发明的siRNA双链体和DNA载体的给药的材料和方法在本领域中是众所周知的,并且考虑到RNAi技术的潜力,改进的方法正在开发中。

[0232] 通常,许多技术可用于将核酸导入哺乳动物细胞。技术的选择将取决于核酸是转移到体外培养的细胞中,还是转移到患者体内的细胞中。适于将核酸转移到体外哺乳动物细胞的技术包括脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE、葡聚糖和磷酸钙沉淀。体内基因转移技术包括用病毒(通常是逆转录病毒)载体转染和病毒外壳蛋白脂质体介导的转染(Dzau等人,(2003)Trends in Biotechnology 11,205-210)。

[0233] 具体地,用于在体外和体内对本发明的核酸进行细胞给药的合适技术在以下文章中公开:

[0234] 一般综述:Borkhardt,A.,2002,RNA干扰阻断恶性肿瘤细胞中的癌基因--高特异性癌症治疗的新希望?Cancer Cell.2:167-8;Hannon,G.J.,2002.RNA干扰,Nature.418:244-51;McManus,M.T.,和P.A.Sharp.,2002.通过小干扰RNA在哺乳动物中的基因沉默,Nat Rev Genet.3:737-47;Scherr,M.,M.A.Morgan,和M.Eder.,2003b.在哺乳动物细胞中小干扰RNA介导的基因沉默,Curr Med Chem.10:245-56。Shuey,D.J.,D.E.McCallus和T.Giordano,2002.RNAi:治疗干预中的基因沉默,Drug Discov Today.7:1040-6。

[0235] 使用脂质体的全身给药:Lewis,D.L.,J.E.Hagstrom,A.G.Loomis,J.A.Wolff,和H.Herweijer.,2002.高效递送siRNA抑制出生后小鼠基因表达,Nat Genet.32:107-8。Paul,C.P.,P.D.Good,I.Winer,和D.R.Engelke.,2002.小干扰RNA在人体细胞中的有效表达,Nat Biotechnol.20:505-8。Song,E.,S.K.Lee,J.Wang,N.Ince,N.Ouyang,J.Min,J.Chen,P.Shankar,和J.Lieberman.,2003.靶向Fas的RNA干扰对小鼠暴发性肝炎的保护作用,Nat Med.9:347-51。Sorensen,D.R.,M.Leirdal和M.Sioud.,2003.系统递送合成siRNA对成年小鼠的基因沉默,J Mol Biol.327:761-6。

[0236] 病毒介导的转移:Abbas-Terki,T.,W.Blanco-Bose,N.Deglon,W.Pralong,和P.Aebischer.,2002.慢病毒介导的RNA干扰,Hum Gene Ther.13:2197-201。Barton,G.M.和R.Medzhitov.,2002.逆转录病毒递送小干扰RNA进入原代细胞,Proc Natl Acad Sci U S A.99:14943-5。Devroe,E.和P.A.Silver.,2002.逆转录病毒递送siRNA,BMC Biotechnol.2:15。Lori,F.,P.Guallini,L.Galluzzi和J.Lisziewicz.,2002.HIV感染的基因治疗方法,Am J Pharmacogenomics.2:245-52。Matta、H.、B.Hozayev、R.Tomar、P.Chugh和P.M.Chaudhary.,2003.利用慢病毒载体递送小干扰RNA,Cancer Biol Ther.2:206-10。

Qin,X.F.,D.S.An,I.S.Chen,和D.Baltimore.,2003.慢病毒介导的抗CCR5小干扰RNA在人T细胞中抑制HIV-1感染,Proc Natl Acad Sci U S A.100:183-8。Scherr,M.,K.Battmer,A.Ganser和M.Eder.,2003a.通过慢病毒介导的小干扰RNA递送调节基因表达,Cell Cycle.2:251-7。Shen,C.,A.K.Buck,X.Liu,M.Winkler和S.N.Reske.,2003.腺病毒递送siRNA的基因沉默,FEBS Lett.539:111-4。

[0237] 肽递送:Morris,M.C.,L.Chaloin,F.Heitz和G.Divita.,2000.转位肽和蛋白质及其在基因递送中的应用,Curr Opin Biotechnol.11:461-6。Simeoni,F.,M.C.Morris,F.Heitz,和G.Divita.,2003.以肽为基础的基因递送系统MPG机制的深入研究:siRNA递送到哺乳动物细胞的意义,Nucleic Acids Res.31:2717-24。其他可能适合于将siRNA递送到靶细胞的技术基于纳米颗粒或纳米胶囊,如美国专利号6,649,192B和5,843,509B中描述的那些。

[0238] 抑制IL-11介导的信号传导

[0239] 在本发明的实施方式中,能够抑制IL-11作用的药剂可以具有以下一个或多个功能性质:

[0240] 抑制IL-11介导的信号传导;

[0241] 抑制IL-11与IL-11Rα:gp130受体复合物结合介导的信号传导;

[0242] 抑制IL-11:IL-11Rα复合物与gp130结合介导的信号传导(即IL-11反式信号传导);

[0243] 抑制IL-11介导的一个过程;

[0244] 抑制IL-11、IL-11Rα和/或gp130基因/蛋白的表达。

[0245] 这些性质可以通过在适当的实验中对相关药剂进行分析来确定,这可能涉及将药剂的性能与适当的对照药剂进行比较。本领域技术人员能够为给定的实验确定适当的控制条件。

[0246] IL-11介导的信号传导和/或由IL-11介导的过程包括由IL-11片段和包含IL-11或其片段的多肽复合物介导的信号传导。IL-11介导的信号传导可能是由人IL-11和/或小鼠IL-11介导的信号传导。在IL-11或含IL-11的复合物与IL-11或所述复合物结合的受体结合后,可发生由IL-11介导的信号传导。

[0247] 在一些实施方式中,药剂可以能够抑制IL-11或含IL-11复合物的生物活性。

[0248] 在一些实施方式中,所述药剂是一种或多种信号通路的拮抗剂,所述信号通路通过包括IL-11Rα和/或gp130的受体,例如IL-11Rα:gp130的信号传导而激活。在一些实施方式中,所述药剂能够通过包含IL-11Rα和/或gp130的一种或多种免疫受体复合物抑制信号传导,例如IL-11Rα:gp130。在本发明的各个方面,这里提供的药剂能够抑制IL-11介导的顺式和/或反式信号传导。在根据本发明的各个方面的一些实施方式中,本文提供的药剂能够抑制IL-11介导的顺式信号传导。

[0249] 在一些实施方式中,所述药剂可抑制IL-11介导的信号传导至低于不存在所述药剂(或存在适当的对照药剂)的情况下的信号传导水平的100%,例如,99%或以下、95%或以下、90%或以下、85%或以下、80%或以下、75%或以下、70%或以下、65%或以下、60%或以下、55%或以下、50%或以下、45%或以下、40%或以下、35%或以下、30%或以下、25%或以下、20%或以下、15%或以下、10%或以下、5%或以下或1%或以下之一。在一些实施方式

中,所述药剂能够将IL-11介导的信号传导减少到不存在所述药剂(或存在适当的对照药剂)的情况下的信号传导水平的小于1倍,例如≤0.99倍、≤0.95倍、≤0.9倍、≤0.85倍、≤0.8倍、≤0.75倍、≤0.7倍、≤0.65倍、≤0.6倍、≤0.55倍、≤0.5倍、≤0.45倍、≤0.4倍、≤0.35倍、≤0.3倍、≤0.25倍、≤0.2倍、≤0.15倍、≤0.1倍之一。

[0250] 在一些实施方式中,所述IL-11介导的信号传导可以是通过IL-11与IL-11Rα:gp130受体结合介导的信号传导。例如,可以通过用IL-11处理表达IL-11Rα和gp130的细胞,或通过刺激表达IL-11Rα和gp130的细胞产生IL-11来分析这种信号传导。

[0251] 对于抑制IL-11介导的信号传导的药物的IC50,可以例如通过在人IL-11和所述药剂存在下培养表达IL-11Rα和gp130的BA/F3细胞,并测量3H-胸苷掺入DNA来确定。在一些实施方式中,所述药剂的IC50可以为10μg/ml或以下,优选为≤5μg/ml、≤4μg/ml、≤3.5μg/ml、≤3μg/ml、≤2μg/ml、≤1μg/ml、≤0.9μg/ml、≤0.7μg/ml、≤0.6μg/ml或≤0.5μg/ml之一。

[0252] 在一些实施方式中,所述IL-11介导的信号传导可以是通过IL-11:IL-11Rα复合物与gp130结合介导的信号传导。在一些实施方式中,IL-11:IL-11Rα复合物可以是可溶性的,例如IL-11Rα的胞外结构域和IL-11的复合物,或可溶性IL-11Rα同种型/片段和IL-11的复合物。在一些实施方式中,可溶性IL-11Rα是IL-11Rα的可溶性(分泌)同种型,或者是细胞膜结合的IL-11Rα的胞外区蛋白水解裂解的释放产物。

[0253] 在一些实施方式中,所述IL-11:IL-11Rα复合物可以是细胞结合的,例如细胞膜结合的IL-11Rα和IL-11的复合物。通过IL-11:IL-11Rα复合物与gp130结合介导的信号传导可以通过用IL-11:IL-11Rα复合物处理表达gp130的细胞来分析,例如,包含IL-11的重组融合蛋白,所述融合蛋白通过肽连接子连接到IL-11Rα的胞外区,例如hyper-IL-11。利用IL-11Rα片段(由结构域1-3组成的氨基酸残基1-317;UniprotKB:Q14626)和IL-11(UniprotKB:P20809第22-199位氨基酸残基)构建Hyper IL-11,带有一个20个氨基酸的长连接子(SEQ ID NO:20)。Hyper IL-11的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示。

[0254] 在一些实施方式中,所述药剂可以能够抑制由IL-11:IL-11Rα复合物与gp130结合介导的信号传导,并且还能够抑制由IL-11与IL-11Rα:gp130受体结合介导的信号传导。

[0255] 在一些实施方式中,所述药剂能够抑制由IL-11介导的过程。

[0256] 在一些实施方式中,所述药剂能够抑制IL-11和/或IL-11Rα的基因/蛋白表达。基因和/或蛋白质表达可以如本文所述或通过本领域技术人员熟知的方法来测量。

[0257] 在一些实施方式中,所述药剂可抑制IL-11和/或IL-11Rα的基因/蛋白表达至不存在药剂(或存在适当的对照药剂)的情况下的表达水平的低于100%,例如,99%或以下、95%或以下、90%或以下、85%或以下、80%或以下、75%或以下、70%或以下、65%或以下、60%或以下、55%或以下、50%或以下、45%或以下、40%或以下、35%或以下、30%或以下、25%或以下、20%或以下、15%或以下、10%或以下、5%或以下或1%或以下之一。在一些实施方式中,所述药剂能够抑制IL-11和/或IL-11Rα的基因/蛋白表达至不存在药剂(或存在适当的对照药剂)的情况下的表达水平的小于1倍,例如≤0.99倍、≤0.95倍、≤0.9倍、≤0.85倍、≤0.8倍、≤0.75倍、≤0.7倍、≤0.65倍、≤0.6倍、≤0.55倍、≤0.5倍、≤0.45倍、≤0.4倍、≤0.35倍、≤0.3倍、≤0.25倍、≤0.2倍、≤0.15倍、≤0.1倍之一。

[0258] 肝毒性的治疗/预防

[0259] 本发明提供用于治疗/预防肝毒性和与肝毒性相关的障碍、疾病和病症的方法和物品(药剂和组合物),例如如本文所述。还提供了用于治疗/预防肝毒性和与肝毒性相关的障碍、疾病和病症的方法,例如,如本文所述。

[0260] 治疗是通过抑制IL-11介导的信号传导(即拮抗IL-11介导的信号传导)来实现的。也就是说,本发明通过抑制IL-11介导的信号传导,例如在细胞、组织/器官/器官系统/受试者中,提供对肝毒性和与肝毒性相关的障碍、疾病和病症的治疗/预防。在一些实施方式中,根据本公开的IL-11介导的信号传导的抑制包括在肝脏的细胞(例如肝细胞)中抑制IL-11介导的信号传导。

[0261] 本发明提供一种能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂在治疗或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法中的用途。

[0262] 本发明还提供了一种能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号转导的药剂在制备用于治疗或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法的药物的用途。

[0263] 还提供了一种治疗或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量的能够抑制白细胞介素11(IL-11)介导的信号传导的药剂。

[0264] 在一些实施方式中,本发明提供了在疾病/病症中的肝毒性相关病理的治疗/预防。也就是说,本发明提供了肝毒性在病理上涉及的疾病/病症的治疗/预防。肝毒性相关病理在此进行描述。

[0265] 本领域技术人员将清楚,本发明的治疗和预防用途基本上延伸到将受益于肝毒性和/或肝毒性相关病理的减少的疾病/病症。本发明的治疗和预防用途扩展到任何患有肝毒性和/或与肝毒性相关的紊乱、疾病或病症的受试者。本发明的治疗和预防用途还扩展到患有肝毒性相关病理存在的疾病的任何受试者。

[0266] 在一些实施方式中,本发明提供了由肝毒性引起/加剧的疾病/病症的治疗/预防。在一些实施方式中,提供了肝毒性提供不良预后的受试者的疾病/病症的治疗/预防。

[0267] 在一些实施方式中,待治疗/预防的肝毒性和/或与肝毒性相关联的障碍、疾病或病症可由受影响的器官/组织/受试者,例如与正常、未受影响的器官/组织/受试者(即未受肝毒性和/或与肝毒性相关联的障碍、疾病或病症的影响)相比的以下一个或多个特征来表征:

[0268] 肝功能减退

[0269] 肝酶,例如丙氨酸氨基转移酶(ALT/SGPT)、乳酸脱氢酶(LDH)和/或天冬氨酸氨基转移酶(AST/SGOT)的血清浓度升高;

[0270] AST/ALT比值大于0.5、大于1或大于2;

[0271] 血碱性磷酸酶(ALP)水平升高;

[0272] γ-谷氨酰转肽酶(GGT)水平升高;

[0273] TNFα和IL-1β以及干扰素γ等细胞因子的血清浓度升高;

[0274] 血清白蛋白水平降低;

[0275] 总胆红素(非结合(间接)和结合(直接))的增加,例如在VanWagner LB.JAMA.313(5):516-517所述的参考范围,其通过引用整体并入本文;

[0276] 肝脏质量损失;

[0277] 肝细胞肌动蛋白应激纤维形成增加;

[0278] 小叶中心坏死增加(即肝小叶中心组织坏死)。

[0279] 前一段中所述的特征在本文中也可称为肝毒性的症状/相关性。

[0280] 实验室肝脏检测的参考水平可在例如参见Gowda S等人,Pan Afr Med J.2009;3:17,其通过引用整体并入本文。

[0281] 在一些实施方式中,待治疗/预防的肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症可以通过在受肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症影响的器官/组织/受试者中,例如与正常器官/组织/受试者(即,没有肝毒性或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症)相比,以下一种或多种的增加来表征:IL-11和IL-11Rα中的一种或多种的表达。

[0282] 在一些实施方式中,本发明提供了在与肝毒性相关的疾病/障碍/病症的背景下对肝毒性的治疗/预防,例如,如本文所述。在一些实施方式中,本发明提供对肝毒性和与肝毒性相关的潜在疾病/障碍/病症的治疗/预防。例如,抑制IL-11介导的信号传导可以拮抗IL-11在化疗相关肝毒性中的作用,也可以拮抗IL-11在癌症本身中的作用。

[0283] 根据本发明,肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的治疗/预防可以是肝毒性和/或与IL-11的上调相关的与肝毒性相关的障碍、疾病或病症,例如,在其中显示或可能发生疾病/障碍/病症的症状的细胞或组织中IL-11的上调,或细胞外IL-11或IL-11Rα的上调。

[0284] 与肝毒性相关的紊乱、疾病或病症可能影响任何组织、器官或器官系统。在一些实施方式中,所述疾病/紊乱/病症可以影响几种组织/器官/器官系统。在一些实施方式中,所述疾病/紊乱/病症影响肝脏。

[0285] 在一些实施方式中,与肝毒性相关的障碍、疾病或病症影响以下的一个或多个:心血管系统、消化系统、排泄系统、呼吸系统、肾脏系统、生殖系统、循环系统、肌肉系统、内分泌系统、外分泌系统、淋巴系统、免疫系统、神经系统和/或骨骼系统。

[0286] 在一些实施方式中,本发明提供急性肝损伤(ALI)、急性肝衰竭、急性肝病、慢性肝病、肝损害、肝炎(例如病毒性肝炎、酒精性肝炎)、肝缺血-再灌注损伤(IRI)(例如“热”缺血-再灌注(WIR))、辐射诱导肝病(RILD))、药物性肝损伤(DILI)、异质性药物性肝损伤(IDILI)、自身免疫性肝损伤、胆汁淤积性肝病、HIV、和癌症中的肝毒性相关病理的治疗/预防。

[0287] 治疗可以有效地防止肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的进展,例如减少/延迟/防止肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的恶化,或减少/延迟/防止肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的发展。在一些实施方式中,治疗可导致改善,例如肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的严重程度降低,和/或肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的症状的好转。在一些实施方式中,治疗可以增加生存期。在一些实施方式中,治疗有效地逆转肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的影响和/或症状。

[0288] 具体地,发明人已经证明,通过拮抗IL-11介导的信号传导,有可能减少(即逆转)肝毒性、急性肝衰竭(ALF)和ALF相关死亡率的症状。

[0289] 预防可指预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的发展,和/或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的恶化,例如,预防肝毒性和/或与肝毒性相

关的障碍、疾病或病症发展到晚期或慢性阶段。

[0290] 在一些实施方式中,本发明提供肝移植背景下肝毒性的治疗/预防。IL-11介导的信号传导的拮抗剂可以在移植收获前给供体受试者服用,以最大限度地减少对移植物的损伤。IL-11介导的信号传导的拮抗剂可在移植收获之前和/或之后给予供体受试者,以治疗/预防供体受试者的肝毒性。IL-11介导的信号传导的拮抗剂可在移植前和/或移植后给予受体受试者,以治疗/预防受体受试者的肝毒性。在一些实施方式中,治疗可以有效地改善移植接受/减少移植排斥。

[0291] 根据本发明的各个方面,根据本发明的治疗和/或预防肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法可包括以下一项或多项:

[0292] 减少对肝组织的损伤;

[0293] 减少肝细胞死亡;

[0294] 减少肝细胞中IL-11介导的信号传导;

[0295] 降低肝脏CASP3的活化;

[0296] 提高肝功能;

[0297] 降低血清ALT水平;

[0298] 降低血清AST水平;

[0299] 提高肝脏GSH水平;

[0300] 减少急性肝衰竭;

[0301] 减少暴发性肝衰竭;

[0302] 降低急性肝衰竭相关死亡率;

[0303] 增加肝脏重量;

[0304] 再生肝组织;

[0305] 降低肝脏中ERK和/或JNK的活化(即磷酸化);

[0306] 降低促炎基因/蛋白在肝脏中的表达;

[0307] 降低NOX4基因/蛋白表达;

[0308] 减少肝脏中活性氧的产生;

[0309] 增加PCNA、cyclin D1、cyclin D3和/或cyclin E1基因在肝脏中的基因/表达;

[0310] 增加肝脏中Rb的活化(磷酸化)。

[0311] 本发明还提供了能够抑制IL-11介导的信号传导的药物,用于:减少对肝组织的损伤,减少肝细胞死亡,减少肝细胞中IL-11介导的信号传导,减少肝脏中CASP3的活化,增加肝功能;降低血清ALT水平;降低血清AST水平;提高肝脏GSH水平;减少急性肝衰竭;减少暴发性肝衰竭;降低急性肝衰竭相关死亡率;增加肝脏重量;再生肝组织;降低肝脏ERK和/或JNK激活(即磷酸化);降低促炎基因/蛋白在肝脏的表达;降低NOX4基因/蛋白表达;减少肝脏中活性氧的产生;增加PCNA、cyclin D1、cyclin D3和/或cyclin E1在肝脏中的基因/蛋白表达;和/或增加肝脏中的Rb激活(磷酸化)。

[0312] 在一些实施方式中,本发明提供急性肝损伤(ALI)、急性肝衰竭、急性肝病、慢性肝病、肝损害、肝炎(例如病毒性肝炎、酒精性肝炎)、肝缺血-再灌注损伤(IRI)(例如“热”缺血-再灌注(WIR))、辐射诱导肝病(RILD))、药物性肝损伤(DILI)、异质性药物性肝损伤(IDILI)、自身免疫性肝损伤、胆汁淤积性肝病、HIV、和癌症的治疗/预防。

[0313] 此处所指的“癌症”可以是任何不想要的细胞增殖(或任何通过不想要的细胞增殖而表现出来的疾病)、赘生物或肿瘤或不想要的细胞增殖、赘生物或肿瘤的风险或易感性增加。所述癌症可能是良性或恶性的,可能是原发性或继发性的(转移性的)。赘生物或肿瘤可以是细胞的任何异常生长或增殖,并且可以位于任何组织中。组织的例子包括肾上腺、肾上腺髓质、肛门、阑尾、膀胱、血液、骨、骨髓、大脑、乳房、盲肠、中枢神经系统(包括或不包括大脑)、小脑、子宫颈、结肠、十二指肠、子宫内膜、上皮细胞(例如肾上皮)、胆囊、食道、神经胶质细胞、心脏、回肠、空肠、肾脏、泪腺、喉、肝、肺、淋巴、淋巴结(包括腹部淋巴结、腋窝淋巴结、颈部淋巴结、腹股沟淋巴结、纵隔淋巴结、盆腔淋巴结、主动脉周围淋巴结)、淋巴母细胞、上颌骨、纵隔、肠系膜、肌层、鼻咽部、网膜、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、周围神经系统腹膜、胸膜、前列腺、唾液腺、乙状结肠、皮肤、小肠、软组织、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、舌头、扁桃体、气管、子宫、外阴、白细胞。

[0314] 癌症可以是一种特定的类型。癌症类型的例子包括星形细胞瘤、癌(例如腺癌、肝细胞癌、髓样癌、乳头状癌、鳞状细胞癌)、胶质瘤、淋巴瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、肉瘤(例如血管肉瘤、慢性肉瘤、骨肉瘤)。

[0315] 本文所用的“癌症”可包括以下任一项或多项:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、肾上腺皮质癌,肛门癌、膀胱癌、血癌、骨癌、脑瘤、乳腺癌、女性生殖系统癌症、男性生殖系统癌症、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童肉瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性粒细胞白血病(CML)、结肠直肠癌、结肠癌、子宫内膜癌、子宫内膜肉瘤、食管癌、眼癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道癌症、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌,霍奇金病、下咽癌、卡波西肉瘤、肾癌、喉癌、白血病、白血病、肝癌、肺癌、恶性纤维组织细胞瘤、恶性胸腺瘤、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、鼻腔鼻窦癌、鼻咽癌、神经系统癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、垂体瘤、浆细胞肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、呼吸系统、视网膜母细胞瘤、唾液腺癌、皮肤癌、小肠癌、软组织肉瘤、胃癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、泌尿系统癌、子宫肉瘤、阴道癌、血管系统、华氏巨球蛋白血症、肾母细胞瘤。

[0316] 在特定的实施方式中,本发明提供了肝毒性的预防。在一些实施方式中,提供对IL-11介导的信号传导的抑制,以在肝毒性损伤(例如可以是物理和/或化学的)之前保护免受肝毒性损伤。在肝毒性损伤前抑制IL-11介导的信号传导可以减少肝毒性损伤后的一种或多种肝毒性症状。

[0317] 在特定的实施方式中,本发明提供了肝毒性的治疗。在一些实施方式中,提供对IL-11介导的信号传导的抑制,以减少肝毒性损伤(其可以是例如,物理的、灌注相关的和/或化学的)之后的肝毒性。肝毒性损伤后抑制IL-11介导的信号传导可减少一种或多种肝毒性症状。

[0318] 在进一步的方面,本发明提供了一种能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂,用于与其他治疗/预防干预结合使用以治疗/预防肝毒性(例如药物诱导的肝损伤,例如APAP诱导的肝毒性)。如在Park等人,BMJ Clin Evid.(2015)2015:2101中对APAP过量(以及由此引申的APAP引起的肝毒性)的治疗/预防干预进行了综述,其通过引用整体并入本文。

[0319] 这类干预措施包括旨在最大限度地减少摄入后胃肠道对APAP的吸收的治疗/程序。这些治疗/程序包括洗胃、施用催吐剂或施用活性炭。

[0320] 进一步的干预措施包括旨在维持/增加谷胱甘肽水平的治疗/程序。此类治疗/程序包括给药乙酰半胱氨酸(如N-乙酰半胱氨酸;NAC)、蛋氨酸、半胱胺或骨化醇。

[0321] 进一步的干预包括旨在为受试者提供功能性肝组织的治疗/程序,例如在肝衰竭之后或预期肝衰竭时。此类治疗/程序包括肝移植。

[0322] 另一方面,本发明提供一种能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂,用于治疗/预防受试者中APAP诱导的肝毒性的方法,所述方法包括给受试者施用(i)能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂和(ii)用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的另一种(不同的)药剂。本发明还提供了一种组合(例如组合物),其包括:能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂和用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的另一种(不同的)药剂,用于治疗/预防受试者中APAP诱导的肝毒性的方法,所述方法包括给受试者施用所述组合物。

[0323] 还提供了一种能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂在制备用于治疗/预防受试者中APAP诱导的肝毒性的药物中的用途,所述方法包括给受试者施用(i)能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂和(ii)用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的另一种(不同的)药剂。还提供了一种组合(例如组合物)的用途,其包括:能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂和另一种(不同的)药剂,用于制备治疗/预防APAP诱导的肝毒性的药物,所述药物用于治疗/预防受试者中APAP诱导的肝毒性,所述方法包括给受试者施用该组合物。

[0324] 还提供了一种用于治疗/预防受试者中APAP诱导的肝毒性的方法,所述方法包括给受试者施用(i)能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂和(ii)用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的另一种(不同的)药剂。还提供了一种用于治疗/预防受试者中APAP诱导的肝毒性的方法,所述方法包括施用组合(例如组合物),其包括:(i)一种能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂,和(ii)另一种可用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的(不同的)药剂。

[0325] 在根据本文所述方面的一些实施方式中,可用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的药剂(除了能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂)选自:乙酰半胱氨酸(例如,NAC)、蛋氨酸、半胱胺、骨化三醇、催吐剂或活性炭。在特定的实施方式中,用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的药剂(除了能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂)是乙酰半胱氨酸(例如NAC)。

[0326] 在一些实施方式中,与单独使用任一药剂(即作为单一疗法)时观察到的效果相比,使用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂和用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的另一(不同)药剂的方面提供了改进的治疗效果。在一些实施方式中,与单独使用任一药剂时观察到的效果相比,使用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂和可用于治疗/预防APAP诱导的肝毒性的另一(不同)药剂的方面实现了协同(即超加性)治疗效果。

[0327] 给药

[0328] 能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂的给药优选以“治疗有效”或“预防有效”的量,这足以显示对受试者的益处。

[0329] 在一些实施方式中,所述药物可以在肝毒性损伤(即肝毒性的病因)之前、结合或之后给药。在一些实施方式中,肝毒性损伤是化学的,例如,给予或服用肝毒性剂(例如,肝毒性药物,例如APAP)。在一些实施方式中,肝毒性的病因是物理的,例如,对肝细胞/组织的物理损害,例如由于外科手术、缺血/再灌注或物理损伤。在一些实施方式中,肝毒性损伤是肝毒性的环境来源。

[0330] 在一些实施方式中,能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂在肝毒性损伤之前给

药。所述药剂可在预期肝毒性损伤时给予。所述药剂可被给予以防止/减少随后的肝毒性损伤所导致的肝毒性。在一些实施方式中,所述药剂在肝毒性损伤之前的指定时间内给药。在一些实施方式中,所述药剂在肝毒性损伤前1周内给药,例如在肝毒性损伤前72小时、60小时、48小时、36小时、24小时、16小时、12小时、10小时、8小时、4小时、2小时、1小时或30分钟之一内给药。

[0331] 在一些实施方式中,能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂在肝毒性损伤同时给药(即同时给药)。所述药剂可用于预防/减少肝毒性损伤引起的肝毒性。在一些实施方式中,所述药剂与肝毒性损伤同时给药,例如在肝毒性损伤前/后6小时、4小时、2小时、1小时或30分钟内给药。

[0332] 在一些实施方式中,能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂在肝毒性损伤后给药。所述药剂可被给予以防止/减少先前的肝毒性损伤所导致的肝毒性。所述药剂可在肝毒性发作后给药。所述药剂可以在检测到肝毒性相关后给药。在一些实施方式中,所述药剂在肝毒性损伤后的指定时间内给药。在一些实施方式中,所述药剂在肝毒性损伤后1个月内给药,例如在肝毒性损伤后3周、2周、1周、6天、5天、4天、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时、16小时、12小时、8小时、6小时、4小时、2小时、1小时或30分钟内给药。在一些实施方式中,所述药剂在肝毒性损伤后30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时、12小时、16小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、4天、5天、6天、1周、2周、3周或1个月以上给药。

[0333] 在特定实施方式中,肝毒性损伤是肝毒性制剂的给药/服用。在一些实施方式中,肝毒性剂是直接或间接引起肝毒性的化学物质。在一些实施方式中,肝毒性剂是对乙酰氨基酚。

[0334] 在一些实施方式中,所述药剂在对乙酰氨基酚过量后48小时、36小时、24小时、16小时、12小时、8小时、6小时、4小时、2小时、1小时或30分钟内给药。在一些实施方式中,所述药剂在对乙酰氨基酚过量后30分钟、1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、16小时、24小时、36小时或48小时以上给药。

[0335] 实际给药量、给药率和时间进程将取决于肝毒性的性质和严重程度以及药剂的性质。治疗处方(例如剂量等的决定)由全科医生和其他医生负责,并且通常考虑待治疗的疾病/病症、个体受试者的状况、给药部位、给药方法和其他从业者已知的因素。上述技术和方案的示例可以在2000年由利平科特,威廉&威尔金斯出版社出版的《雷明顿药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)(第20版)中找到。

[0336] 可以提供多种剂量的药剂。一个或多个或每个剂量可以用于同时或依次施用另一种治疗剂。

[0337] 多个剂量可以通过预定时间间隔分开,该预定时间间隔可选择为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天之一,或1、2、3、4、5或6个月。举例来说,剂量可以每7、14、21或28天(正负3、2或1天)给予一次。

[0338] 在治疗应用中,能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂优选与本领域技术人员所熟知的一种或多种其它药学上可接受的成分一起配制成药剂或药物,包括但不限于药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂、稀释剂、填料、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂(例如润湿剂)、掩蔽剂、着色剂、调味剂和甜味剂。

[0339] 本文所用的术语“药学上可接受的”涉及化合物、成分、材料、组合物、剂型等,它们

在合理的医学判断范围内,适合于与所述受试者(例如,人类)的组织接触使用,而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。每种载体、佐剂、赋形剂等也必须是“可接受的”,即与制剂的其他成分相容。

[0340] 合适的载体、佐剂、赋形剂等可在标准药学文本中找到,例如,《雷明顿药学》(第18版)第18版,Mack出版公司,Easton,Pa.,1990;和《药用辅料手册》,1994年第2版。

[0341] 所述制剂可以通过药剂学领域公知的任何方法制备。这种方法包括将活性化合物与构成一种或多种辅助成分的载体结合的步骤。通常,通过将活性化合物与载体(例如,液体载体,细小的固体载体等)均匀地紧密结合,然后在必要时对产品进行成型来制备制剂。

[0342] 所述制剂可制备为用于局部、胃肠外、全身、静脉、动脉内、肌肉内、鞘内、眼内、结膜内、皮下、口服或经皮途径给药,包括注射。可注射制剂可包含在无菌或等渗介质中的所选制剂。可根据待治疗的药剂和疾病/障碍/病症选择给药的制剂和方式。

[0343] 在某些情况下,本文所述的物品(例如,药剂/组合物)与用于与肝毒性相关的疾病/障碍/病症的治疗相结合进行本文所述的治疗。与肝毒性相关的疾病/障碍/病症的合适治疗是本领域中已知的。根据要治疗的疾病/障碍/病症,组合物可以单独给药,也可以与其他治疗方法联合给药,可以同时给药,也可以顺序给药。例如,所述物品可以在治疗之前、同时或之后给药。所述物品和所述治疗可以一起配制,例如以上述配制,或者单独配制。

[0344] 在根据采用药剂组合的方面的一些实施方式中,所述药剂可以同时或顺序地给药。同时给药是指作为含有两种药物(联合制剂)的组合物给药,或立即在彼此之后并任选地通过相同的给药途径给药,例如给药到相同的动脉、静脉或其他血管。顺序给药是指一种药剂给药后在给定时间间隔后施用另一种药剂。不需要通过相同的途径来施用两种药剂,尽管在某些实施方式中是这种情况。所述时间间隔可以是任何时间间隔。

[0345] IL-11及其受体的检测

[0346] 本发明的一些方面和实施方式涉及检测从受试者获得的样品中IL-11或IL-11受体(例如IL-11Rα、gp130,或含有IL-11Rα和/或gp130的复合物)的表达。

[0347] 在一些方面和实施方式中,本发明涉及IL-11或IL-11受体(作为编码相应IL-11或IL-11受体的蛋白质或寡核苷酸)的表达上调(过表达),以及检测这种上调作为用能够抑制IL-11作用的药剂或用能够防止或减少IL-11或IL-11受体表达的药剂进行治疗的适用性的指示剂。

[0348] 上调表达包括高于给定类型的细胞或组织通常预期水平的表达。上调可通过测量细胞或组织中相关因子的表达水平来确定。可以在来自受试者的细胞或组织样本中的表达水平与相关因子的参考表达水平之间进行比较,例如,表示相同或相应细胞或组织类型的相关因子的正常表达水平的值或值范围。在一些实施方式中,可通过检测对照样品中例如来自健康受试者或来自同一受试者的健康组织的相应细胞或组织中的IL-11或IL-11受体的表达来确定参考水平。在一些实施方式中,可以从标准曲线或数据集获得参考水平。

[0349] 表达水平可以定量进行绝对比较,也可以进行相对比较。

[0350] 在一些实施方式中,当测试样品中的表达水平至少是参考水平的1.1倍时,可以认为存在IL-11或IL-11受体(例如IL-11Rα、gp130、或含有IL-11Rα和/或gp130的复合物)的上调。更优选地,表达水平可选自参考水平的至少1.2、至少1.3、至少1.4、至少1.5、至少1.6、至少1.7、至少1.8、至少1.9、至少2.0、至少2.1、至少2.2、至少2.3、至少2.4至少2.5、至少

2.6、至少2.7、至少2.8、至少2.9、至少3.0、至少3.5、至少4.0、至少5.0、至少7.0、至少8.0、至少9.0或至少10.0倍之一。

[0351] 表达水平可以由许多已知的体外检测技术之一来确定,如基于PCR的检测,原位杂交检测,流式细胞术检测,免疫学或免疫组织化学检测。

[0352] 例如,适当的技术涉及通过使样品与能够结合IL-11或IL-11受体的药剂接触并检测药剂与IL-11或IL-11受体的复合物的形成来检测样品中IL-11或IL-11受体水平的方法。所述药剂可以是任何合适的结合分子,例如抗体、多肽、肽、寡核苷酸、适体或小分子,并且可以任选地被标记以允许对所形成的复合物进行检测,例如可视化检测。合适的标记物和用于其检测的方法为本领域技术人员所熟知,包括荧光标记物(例如荧光素、罗丹明、伊红和NDB、绿色荧光蛋白(GFP)、稀土螯合物如铕(Eu)、铽(Tb)和钐(Sm)、四甲基罗丹明、德克萨斯红、4-甲基伞形酮、7-氨基-4-甲基香豆素、Cy3、Cy5)、同位素标记物、放射性同位素(例如32P、33P、35S)、化学发光标记物(例如吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺)、酶(例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶)、抗体、配体和受体。检测技术是本领域技术人员所熟知的,并且可以选择与标记试剂相对应的检测技术。合适的技术包括寡核苷酸标签的PCR扩增、质谱分析、荧光或颜色的检测,例如通过报告蛋白将底物酶促转化或放射性检测。

[0353] 测定可以被配置为定量样品中的IL-11或IL-11受体的量。可以将来自测试样品的IL-11或IL-11受体的定量的量与参考值进行比较,该比较用于确定测试样品中的IL-11或IL-11受体的量是否高于或低于参考值的量,达到选定的统计显著程度。

[0354] 检测到的IL-11或IL-11受体的定量可用于确定编码IL-11或IL-11受体的基因的上调或下调或扩增。在试验样品含有纤维化细胞的情况下,可以将这种上调、下调或扩增与参考值进行比较,以确定是否存在任何统计学上显著的差异。

[0355] 从受试者获得的样本可以是任何种类的。生物样本可以从任何组织或体液中提取,例如血液样本、血液来源样本、血清样本、淋巴样本、精液样本、唾液样本、滑液样本。血液来源的样本可以是患者血液的选定部分,例如选定的含细胞部分或血浆或血清部分。样本可以包括组织样本或活检;或者从受试者身上分离出来的细胞。样本可以通过已知的技术收集,如活检或针吸。样品可被储存和/或处理以用于后续IL-11表达水平的测定。

[0356] 样品可用于测定所取样品的受试者中IL-11或IL-11受体的上调。

[0357] 在一些优选实施方式中,样本可以是取自肝组织、心脏组织、内脏器官组织、呼吸系统器官组织或泌尿/肾系统组织的组织样本,例如活检。样品中可能含有细胞。

[0358] 根据本发明,可以基于确定受试者具有上调的IL-11或IL-11受体(例如IL-11Rα、gp130,或含有IL-11Rα和/或gp130的复合物)的表达水平来选择受试者进行治疗/预防。IL-11或IL-11受体的上调表达可作为肝毒性和/或适于用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂治疗的与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的标记。

[0359] 上调可能在给定的组织中,也可能在来自给定组织的选定细胞中。优选的组织可以是肝组织。IL-11或IL-11受体表达的上调也可在循环流体例如血液中或在血液来源的样品中测定。上调可以是细胞外IL-11或IL-11Rα。在一些实施方式中,表达可以局部地或全身地上调。

[0360] 在选择之后,可以给受试者施用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂。

[0361] 诊断与预后

[0362] 检测IL-11或IL-11受体(例如IL-11Rα、gp130或含有IL-11Rα和/或gp130的复合物)的表达上调也可用于诊断肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的方法,鉴别有发展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的风险的受试者,以及用于预后或预测受试者对使用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂治疗的反应的方法。

[0363] “发生”、“进展”和其他形式的“发展”可指疾病/病症的出现,或疾病/病症的持续或进展。

[0364] 在一些实施方式中,例如,基于在受试者体内或受试者体内的选定细胞/组织中存在指示肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的其他症状,可以怀疑受试者具有或遭受肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症,或者被认为有发展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的风险,例如,由于遗传易感性或暴露于环境条件,已知环境条件是肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的风险因素。IL-11或IL-11受体表达上调的测定可证实诊断或可疑诊断,或可证实受试者有发展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的风险。该测定还可以诊断肝毒性和/或与肝毒性或易感性相关的障碍、疾病或病症,作为适合于用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂治疗的疾病。

[0365] 因此,可以提供一种为患有或怀疑患有肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的受试者提供预后的方法,所述方法包括确定从受试者获得的样品中IL-11或IL-11受体的表达是否上调,并基于该确定,提供用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂治疗受试者的预后。

[0366] 在一些方面,诊断方法或预后或预测受试者对使用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂治疗的反应的方法可以不需要确定IL-11或IL-11受体的表达,但可以基于确定受试者中预测表达或活性上调的遗传因素。这些遗传因素可以包括IL-11、IL-11Rα和/或gp130的基因突变、单核苷酸多态性(SNPs)或基因扩增的测定,这些与表达或活性上调和/或IL-11介导的信号传导相关和/或是可预测的。使用遗传因素来预测疾病状态的易感性或对治疗的反应在本领域中是已知的,例如参见Peter Stärkel Gut2008;57:440-442;Wright等人,Mol.Cell.Biol.,2010年3月,第20卷,第6期,1411-1420。

[0367] 遗传因子可以通过本领域普通技术人员已知的方法进行分析,包括基于PCR的分析,例如定量PCR、竞争PCR。通过确定遗传因子的存在,例如在从受试者获得的样本中,可以确认诊断,和/或受试者可以被分类为处于发展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的风险中,和/或受试者可以被鉴别为适合于用能够抑制IL-11介导的信号传导的药物治疗。

[0368] 一些方法可以包括确定与IL-11分泌或肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的发展的易感性相关联的一个或多个SNP的存在。SNP通常是双等位基因的,因此可以使用本领域技术人员已知的许多常规分析中的一种来容易地确定(例如,参见Anthony J.Brookes,SNPS的本质,Gene,第234卷,第2期,1999年7月8日,177-186;Fan等人,高度平行的SNP基因分型,Cold Spring Harb Symp Quant Biol,2003,68:69-78;Matsuzaki等人,使用高密度寡核苷酸阵列上的单引物分析对超过10,000个SNP进行平行基因分型,Genome Res.,2004,14:414-425)。

[0369] 所述方法可以包括确定从受试者获得的样品中存在哪个SNP等位基因。在一些实

施方式中,确定次要等位基因的存在可能与增加的IL-11分泌或对肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的发展的易感性相关。

[0370] 因此,在本发明的一个方面中,提供了一种用于筛选对象的方法,该方法包括:

[0371] 从受试者获得核酸样本;

[0372] 确定在WO 2017/103108 A1的图33、图34或图35(其通过引用并入本文)中列出的一个或多个SNP的多态性核苷酸位置上存在哪个等位基因,或与列出的SNP之一发生连锁不平衡的SNP,其$r^2 \geq 0.8$。

[0373] 所述确定步骤可包括确定所述次要等位基因是否存在于所述样品中的选择的多态性核苷酸位置。它可以包括确定是否存在0、1或2个次要等位基因。

[0374] 筛选方法可以是用于确定受试者对肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的发展的易感性的方法,或者是本文所述的诊断或预后方法的一部分。

[0375] 所述方法还可以包括步骤,例如,如果确定受试者在多态性核苷酸位置上具有次要等位基因,则将受试者确定为具有发生肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的易感性或风险增加。所述方法还可以包括选择受试者进行治疗的步骤,所述受试者用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂治疗和/或向受试者施用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂,以便对受试者中的肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症提供治疗,或者防止受试者中的肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的发展或进展。

[0376] 可确定的SNP包括WO 2017/103108 A1的图33、图34或图35中列出的一个或多个SNP(通过引用并入本文)。可以选择SNP以确定为具有低P值或FDR(错误发现率)。

[0377] 在一些实施方式中,本文描述的方法可以包括确定受试者中肝毒性相关遗传因子的存在或不存在,例如Njoku DB,Int J Mol Sci.2014;15(4):6990-7003;Khoury T等人,J Clin Transl Hepatol.2015;3(2):99-108;Ahmad J和Odin JA,Clin Liver Dis.2017;21(1):5-72;Clare等人,Curr Hepatol Rep.2017;16(3):258-264和Urban TJ等人,Pharmacogenomics.2012年5月;13(7):735-738中描述的那些,其通过引用整体并入本文。在一些实施方式中,本文描述的方法可以包括确定待治疗的受试者对于细胞色素P450(CYP450)同种型CYP2E1是杂合还是纯合。根据本发明的方法和用途可以包括确定受试者的CYP2E1基因型和/或选择CYP2E1杂合子或纯合子的治疗受试者的步骤。

[0378] 在一些实施方式中,一种诊断肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症,识别有发展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症风险的受试者的方法,以及预后或预测受试者对使用能够抑制IL-11介导的信号传导的试剂的治疗的反应的方法,使用的指示物不是检测IL-11或IL-11受体的表达上调或遗传因素。

[0379] 在一些实施方式中,诊断肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症,识别有发展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症风险的受试者的方法,以及预后或预测受试者对使用能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂治疗的反应的方法基于检测、测量和/或识别以下指标中的一个或多个:

[0380] 肝酶,比如丙氨酸氨基转移酶(ALT/SGPT)、乳酸脱氢酶(LDH)和/或天冬氨酸氨基转移酶(AST/SGOT)的血清浓度升高;

[0381] AST/ALT比值大于0.5、大于1或大于2;

[0382] 血碱性磷酸酶(ALP)水平升高;

[0383] γ—谷氨酰转肽酶(GGT)水平升高;

[0384] TNFα和IL-1β以及干扰素γ等细胞因子的血清浓度升高;

[0385] 血清白蛋白水平降低;

[0386] 总胆红素(非结合(间接)和结合(直接))的增加,例如在VanWagner LB.JAMA.313(5):516-517中所述的参考范围,其通过引用整体并入本文;

[0387] 肝脏质量损失;

[0388] 肝细胞肌动蛋白应激纤维形成增加;

[0389] 小叶中心坏死增加(即肝小叶中心组织坏死)。

[0390] 皮肤和眼白发黄(黄疸);

[0391] 瘙痒;

[0392] 腹部右上部腹痛;

[0393] 疲劳;

[0394] 食欲不振;

[0395] 恶心呕吐;

[0396] 皮疹;

[0397] 体重减轻;

[0398] 深色或茶色的尿液。

[0399] 实验室肝脏检测的参考水平可在例如参见Gowda S等人,Pan Afr Med J.2009;3:17,其通过引用整体并入本文。

[0400] 诊断或预测方法可以在体外对获自受试者的样品进行,或在对获自受试者的样品进行处理之后进行。一旦收集了样品,就不需要患者存在于待进行的诊断或预测的体外方法,因此该方法可以是在人体或动物体上不实践的一种方法。如上所述,从受试者获得的样品可以是任何种类的。

[0401] 其他诊断或预后检测可以与此处描述的检测结合使用,以增强诊断或预后的准确性或确认通过使用此处描述的检测获得的结果。

[0402] 受试者

[0403] 受试者可以是动物或人。受试者优选哺乳动物,更优选人类。所述受试者可以是非人类哺乳动物,但更优选是人类。所述受试者可以是男性或女性。所述受试者可以是患者。患者可能具有肝毒性和/或与本文所述的肝毒性相关的障碍、疾病或病症。受试者可能已被诊断为需要治疗的肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症,可能被怀疑具有这种肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症,或者可能处于发展肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的风险中。

[0404] 在根据本发明的实施方式中,所述受试者优选是人类受试者。在根据本发明的实施方式中,可根据基于肝毒性和/或与肝毒性相关的障碍、疾病或病症的一个或多个标记(相关性/症状)的特征的方法选择受试者进行治疗。

[0405] 在一些实施方式中,可以基于确定受试者已经经历、将要经历或正在经历肝毒性损伤来选择受试者进行根据本发明的治疗。在一些实施方式中,在将要或可能导致肝毒性预期干预(例如手术,例如用与肝毒性相关的药剂治疗)之前,可选择受试者进行根据本发明的治疗。在一些实施方式中,在确定受试者已经经历或正在经历肝毒性或肝毒性损伤之

后,可选择受试者进行根据本发明的治疗。

[0406] 提供的进一步方法和用途

[0407] 本发明还提供了一种能够抑制IL-11介导的信号传导的制剂用于,或能够抑制IL-11介导的信号传导的制剂在以下方法中的用途:减少对肝组织的损伤;减少肝细胞死亡;增加肝功能;降低血清ALT水平;增加肝脏重量;再生肝组织或降低肝脏中ERK和/或JNK激活(即磷酸化)。

[0408] 本发明还提供了一种能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂的用途,该药剂用于制造一种组合物,所述组合物用于以下方法:减少对肝组织的损伤;减少肝细胞死亡;增加肝功能;降低血清ALT水平;增加肝脏重量;再生肝组织或降低肝脏中ERK和/或JNK激活(即磷酸化)。

[0409] 本发明还提供了以下方法:减少对肝组织的损伤;减少肝细胞死亡;增加肝功能;降低血清ALT水平;增加肝脏重量;再生肝组织或减少肝中的ERK和/或JNK激活(即磷酸化),所述方法包括向受试者施用有效量的能够抑制IL-11介导的信号传导的药剂。

[0410] 序列同一性

[0411] 为了确定两个或更多个氨基酸或核酸序列之间的序列同一性百分比的目的,成对和多序列比对可以以本领域技术人员已知的多种方式来实现,例如,使用诸如ClustalOmega(Söding,J.2005,Bioinformatics 21,951-960)、T-Coffee(Notredame等人,2000,J.Mol.Biol.(2000)302,205-217)、Kalign(Lassmann和Sonnhammer 2005,BMC Bioinformatics,6(298))和MAFFT(Katoh和Standley2013,Molecular Biology and Evolution,30(4)772-780)之类的可公开获得的计算机软件。使用此类软件时,优选使用默认参数(例如对于空位罚分和延伸罚分)。

[0412] 序列

[0413]

SEQ ID NO：	描述	序列
1	人 IL-11 （ UniProt P20809)	MNCVCRLVLVVLSLWPDTAVAPGPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLLADTRQ LAAQLRDKFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHVQ WLRRAGGSSLKTLEPELGTLQARLDRLLRRLQLLMSRLALPQPPPDPPAPPLAPPS SAWGGIRAAHAILGGLHLTLDWAVRGLLLLKTRL
2	人 gp130 （ UniProt P40189-1)	MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPCGYISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMD YFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFGQLEQ NVYGITIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKF ADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPN PPHNLSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRS SFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKID PSHTQGYRTVQLVWKTLPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNL TNDRYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWVEWT TPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPV YADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRN YTIFYRTIIGNETAVNVDSSHTEYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFT TPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTTLLGVLFCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQ WSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSVVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKIN TEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVF SRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCSQHESSPDISHFER SKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERF ETVGMEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ
3	人 IL11RA （ UniProt Q14626)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCPQAWGPPGVQYGQPGRSVKLCCPGVTAG DPVSWFRDGEPKLLQGPDSGLGHELVLAQADSTDEGTYICQTLDGALGGTVTLQ LGYPPARPVVSCQAADYENFSCTWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPS TGPWPCPQDPLGAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSILRPD PPQGLRVESVPGYPRRLRASWTYPASWPCQPHFLLKFRLQYRPAQHPAWSTVEP AGLEEVITDAVAGLPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGTIPKEIPAWG QLHTQPEVEPQVDSPAPPRPSLQPHPRLLDHRDSVEQVAVLASLGILSFLGLVAGA LALGLWLRLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL
4	siRNA靶标IL-11	CCTTCCAAAGCCAGATCTT
5	siRNA靶标IL-11	GCCTGGGCAGGAACATATA
6	siRNA靶标IL-11	CCTGGGCAGGAACATATAT
7	siRNA靶标IL-11	GGTTCATTATGGCTGTGTT
8	siRNA靶标IL-11Rα	GGACCATACCAAAGGAGAT
9	siRNA靶标IL-11Rα	GCGTCTTTGGGAATCCTTT
10	siRNA靶标IL-11Rα	GCAGGACAGTAGATCCCT
11	siRNA靶标IL-11Rα	GCTCAAGGAACGTGTGTAA
12	IL-11 的 siRNA(NM_000641.3)	CCUUCCAAAGCCAGAUCUUdTdT-AAGAUCUGGCUUUGGAAGGdTdT
13	IL-11 的 siRNA(NM_000641.3)	GCCUGGGCAGGAACAUAUAdTdT-UAUAUGUUCCUGCCCAGGCdTdT
14	IL-11 的 siRNA(NM_000641.3)	CCUGGGCAGGAACAUAUAUdTdT-AUAUAUGUUCCUGCCCAGGdTdT
15	IL-11 的 siRNA(NM_000641.3)	GGUUCAUUAUGGCUGUGUUdTdT-AACACAGCCAUAAUGAACCdTdT
16	IL-11R α 的 siRNA(u32324.1)	GGACCAUACCAAAGGAGAUdTdT-AUCUCCUUUGGUAUGGUCCdTdT
17	IL-11R α 的	GCGUCUUUGGGAAUCCUUUdTdT-AAAGGAUUCCCAAAGACGCdTdT

[0414]

	siRNA(u32324.1)	
18	IL-11R α 的siRNA(u32324.1)	GCAGGACAGUAGAUCCCUAdTdT-UAGGGAUCUACUGUCCUGCdTdT
19	IL-11R α 的siRNA(u32324.1)	GCUCAAGGAACGUGUGUAAdTdT-UUACACACGUUCCUUGAGCdTdT
20	20氨基酸接头	GPAGQSGGGGGSGGGSGGGSV
21	Hyper IL-11(IL-11RA:IL-11融合)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCPQAWGPPGVQYGQPGRSVKLCCPGVTAG DPVSWFRDGEPKLLQGPDSGLGHELVLAQADSTDEGTYICQTLDGALGGTVTLQ LGYPPARPVVSCQAADYENFSCTWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPS TGPWPCPQDPLGAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSILRPD PPQGLRVESVPGYPRRLRASWTYPASWPCQPHFLLKFRLQYRPAQHPAWSTVEP AGLEEVITDAVAGLPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGPAGQSGGGG GSGGGSGGGSVPGPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLLADTRQLAAQLRDKFPA DGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHVQWLRRAGGSSLK TLEPELGTLQARLDRLLRRLQLLMSRLALPQPPPDPPAPPLAPPSSAWGGIRAAHA ILGGLHLTLDWAVRGLLLLKTRL
22	*IL11* 基因分型引物F	GGAGGGAGGGGACGCCAATGACC
23	*IL11* 基因分型引物R	TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG
24	*IL11-荧光素酶*基因分型引物F	AATTCCGTGGTGTTGTCG
25	*IL11-荧光素酶*基因分型引物R	TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG
26	*IL11-EGFP*基因分型引物F	GAAATGAGAGCCTAGAGTCCAGAG
27	*IL11-EGFP*基因分型引物R	GAGGCTTGGAAGAATGCACAATTA

[0415] ***

[0416] 本发明包括所描述的方面和优选特征的组合,除非明显不允许或明确避免这种组合。

[0417] 上述描述、或以下权利要求或附图中公开的特征,以其特定形式或者以执行所公开功能的手段、或者用于获得所公开结果的方法或过程(视情况而定)表示的特征可以单独地或者以这些特征的任何组合表示,用于以各种形式实现本发明。

[0418] 为了避免任何疑问,本文提供的任何理论解释是为了提高读者的理解。发明人不希望受到任何这些理论解释的束缚。

[0419] 本文使用的任何章节标题仅用于组织目的,并且不应解释为限制所描述的主题。

[0420] 在整个说明书中,包括所附的权利要求书,除非上下文另有要求,否则词语“包含”和“包括”以及诸如“含有”、“具有”和“其中包括”的变体将被理解为暗示包括陈述的整数或步骤或一组整数或步骤,但不排除任何其他整数或步骤或一组整数或步骤。

[0421] 必须注意的是,除非上下文另外明确指出,在说明书和所附权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数对象。范围可以在本文中表示为从“约”一个特定值和/或到“约”另一特定值。当表达这样的范围时,另一实施例包括从一个特定值和/或至另一特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,将理解的是,特定值形成另一实施例。相对于数值的术语“约”是可选的,并且是指例如+/-10%。

[0422] 可以在体外、离体或体内进行本文公开的方法,或者可以存在产品。术语“体外”旨在包括在实验室条件下或在培养条件下用材料、生物物质、细胞和/或组织进行的实验,而术语“体内”旨在包括用完整的多细胞有机体的实进行验和程序。“离体”是指在有机体外部存在或发生的事物,例如在人体或动物体外,可能在组织(例如,整个器官)或从生物体获取的细胞上。

[0423] 在本文公开了核酸序列的情况下,也明确考虑了其反向互补。

[0424] 关于标准分子生物学技术,见Sambrook,J.,Russel,D.W,《分子克隆,实验室手册》,第3版,2001年,纽约冷泉港:冷泉港实验室出版社。

[0425] 现在将参考附图讨论本发明的方面和实施例。对于本领域技术人员而言,其他方面和实施例将是显而易见的。本文中提及的所有文件均通过引用并入本文。尽管已经结合以下示例性实施例描述了本发明,但是当给出本公开时,许多等同的修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,以上阐述的本发明的示例性实施例被认为是说明性的而不是限制性的。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所描述的实施例进行各种改变。

[0426] 附图简要说明

[0427] 现在将参考附图讨论说明本发明原理的实施方式和实验。

[0428] 图1A至1C.IL-11对肝细胞的影响。(1A)原代人肝细胞表达IL-11Rα受体。(1B)IL-11处理后,肝细胞上清液中ALT水平和肌动蛋白应激纤维数量呈剂量依赖性增加(0.019-10ng/ml)。(1C)H_2O_2诱导中的IL-11表达。

[0429] 图2A至2E.抗IL-11治疗对APAP肝损伤小鼠肝毒性的影响。以IgG抗体作对照。(2A)示意图显示了治疗方案。(2B)APAP诱导毒性后血清IL-11水平。(2C)ALT水平显示肝损伤程度。(2D)APAP引起的肝脏重量损失的程度。(2E)苏木精和伊红(H&E)染色显示抗IL-11Rα抗体或IgG对照处理小鼠肝组织小叶中心坏死的程度。

[0430] 图3.散点图显示抗IL11Ra抗体可防止APAP介导的肝细胞死亡。在存在或不存在抗IL11RA(X209,2μg/ml)或IgG对照抗体的情况下,用APAP(20mM)处理人肝细胞。细胞随后用膜联蛋白V和PI染色,流式细胞仪分析细胞死亡情况。BL＝基线。

[0431] 图4.蛋白免疫印迹图像显示抗IL11Ra抗体阻止APAP介导的Erk和Jnk激活。在存在或不存在抗IL11RA(X209,2μg/ml)或IgG对照抗体的情况下,用APAP(10mM)处理人肝细胞。制备细胞提取液,进行蛋白质免疫印迹评估Erk和Jnk激酶的活化(磷酸化)状态。BL＝基线。

[0432] 图5A和5B.箱线图和图像显示,在APAP过量前16小时给予抗IL11RA治疗可防止急性肝损伤。给小鼠腹腔给药20mg/kg抗IL11Ra抗体(ENx209)或IgG对照抗体后16小时,给药严重过量的APAP(400mg/kg)。24小时后对小鼠实施安乐死。(5A)血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)作为急性肝损伤和肝细胞死亡的标志物被检测。(5B)收获肝脏,用10％中性缓冲福尔马林固定,脱水,石蜡块包埋,切片,苏木精和伊红染色,观察APAP过量所见的特征性小叶中心肝细胞坏死。

[0433] 图6A和6B.图像和箱线图显示APAP过量后10小时给予抗IL11RA治疗急性肝损伤。小鼠给药严重过量的APAP(400mg/kg),10h后腹腔给药20mg/kg抗IL11RA抗体(ENx209)或IgG对照抗体。(6A)在指定的时间点收获肝脏并在10％中性缓冲福尔马林中固定,并记录大体形态和外观。(6B)血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)作为急性肝损害和肝细胞死亡的标志物被测定。

[0434] 图7.蛋白质免疫印迹的图像显示APAP过量10小时后给予抗IL11RA治疗抑制Jnk和ERK的激活。小鼠给药严重过量的APAP(400mg/kg),10h后腹腔给药20mg/kg抗IL11RA抗体(ENx209)或IgG对照抗体。在指定的时间点收获肝脏,并进行蛋白质免疫印迹评估Erk和Jnk激酶的激活(磷酸化)状态。

[0435] 图8A至8C.图形、图像和箱线图显示APAP过量后10小时给予抗IL11RA治疗可防止急性肝损伤死亡,并恢复肝功能。小鼠给药致死过量的APAP(550mg/kg),10h后腹腔给药20mg/kg抗IL11RA抗体(ENx209)或IgG对照抗体。(8A)图形显示了两个治疗组用药过量后8

天内死亡率。(8B)在指定的时间点收获肝脏并在10％中性缓冲福尔马林中固定,并记录大体形态和外观。(8C)在过量后8天,ENx209治疗小鼠中的血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测作为肝损害和肝细胞死亡的标志物,并与正常对照组进行比较。

[0436] 图9A至9J.图形和图像显示对乙酰氨基酚诱导的从受伤的肝细胞的IL11分泌导致细胞死亡。(A)APAP处理小鼠血清IL11水平。(B)APAP损伤后的肝脏IL11 mRNA。(C)对照组和APAP攻击的IL11-荧光素酶小鼠肝脏荧光素酶活性的代表性图像。(D)蛋白质免疫印迹显示APAP处理小鼠肝脏IL11表达。(E)APAP处理后,在IL11-EGFP小鼠的肝组织中EGFP和裂解的Caspase3(Cl.CASP3)表达的代表性免疫荧光图像(标尺,100μm)。(A-E)APAP,400mg kg^{-1}。(F)从APAP刺激的肝细胞分泌IL11的ELISA检测。(G)磷酸化ERK、JNK和CI的蛋白免疫印迹。CASP3蛋白及其在肝细胞中相应的总表达对rhIL11刺激的响应。(H)来自rhIL11刺激的肝细胞的碘化丙啶阳性(PI^{+VE})细胞定量。(I)蛋白质免疫印迹显示ERK、JNK和CASP3激活状态和(J)在IgG或抗IL11RA(x209;2μg ml^{-1})存在下,APAP处理的肝细胞(20mM)中PI^{+VE}细胞的定量。(F-J)原代人肝细胞(F,H-J)24h。(A、B、F、H-I)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱),和最小-最大值(须)的须图的形式显示。(A,B)双尾Student's t-检验;(F,H)双尾邓尼特检验;(J)双尾,Tukey校正的Student's t-检验。

[0437] 图10A至10L.图像、图形和示意图显示了重组人IL11在小鼠肝细胞中抑制小鼠IL11效应。(A)重组人IL11(rhIL11,10ng ml^{-1}或重组小鼠IL11(rmIL11,10ng ml^{-1})对小鼠肝细胞ERK、JNK和CASP3的激活状态的影响。(B)通过rmIL11(10ng ml^{-1})或通过增加rhIL11剂量(1,5,10,15和20ng ml^{-1})刺激后,小鼠肝细胞上清液中ALT的水平。(C)小鼠接受单次皮下注射生理盐水、rhIL11或rmI111(500μg kg^{-1})的示意图。(D)肝p-ERK、p-JNK和Cl.CASP3的蛋白质免疫印迹分析和(E)如图10C所示实验的血清ALT水平;对于每个时间段(6h、24h),从左到右的箱分别对应生理盐水、rmIL11和rhIL11处理(F)小鼠在APAP OD前2h皮下注射生理盐水、rhIL11或rmIL11的示意图。APAP OD前注射rhIL11或rmIL11对(G)6和24h血清ALT测定(每个时间段(6h、24h),从左至右的箱分别为生理盐水、rmIL11和rhIL11处理)和(H)APAP给药后24h肝脏ERK和JNK活性的影响。(I)传感器图显示mIL11RA1与固定化rhIL11(左)和rmIL11(中)的结合,以及hIL11RA与rhIL11(右)的结合。显示了实验数据和理论拟合曲线(1:1Langmuir)。(J)通过竞争ELISA法,在rmIL11(深灰色点,上方的线)和rhIL11(浅灰色点,下方的线)两倍稀释的情况下,生物素化的rmIL11与mIL11RA1结合。rhIL11对rmIL11诱导的(K)ALT分泌和(L)小鼠肝细胞对CASP3的激活的剂量依赖性抑制作用。(A,B,K,L)24h。(B、K)数据显示为均值±SD;(E,G)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图形式显示。(B、K)双尾,Tukey校正的学生的Student's t-检验;(E)双尾Student's t-检验;(G)双尾邓尼特检验。FC:倍数变化

[0438] 图11A至11Q.示意图、图像和图形显示IL11通过NOX4依赖性谷胱甘肽耗竭导致肝衰竭。(A)$ROSA26^{IL11/+}$小鼠单次静脉注射AAV8-ALB-Null(对照)或AAV8-ALB-Cre(IL11-Tg)以特异性诱导IL11在表达白蛋白的细胞(肝细胞)中过表达的示意图;ALB:白蛋白。(B)代表性的肝脏大体解剖学,(C)肝脏重量,(D)血清ALT水平,(E)代表性的H&E染色肝脏图像(标尺,100μm),(F)p-ERK、p-JNK和CL.CASP3的蛋白质免疫印迹,(G)肝脏GSH水平,和(H)对照和IL11-Tg小鼠注射后3周的NOX4 mRNA表达水平。(I)时程GSH水平,(J)GSH水平的剂量依赖性降低,以及(K)蛋白质免疫印迹显示rhIL11处理的原代人肝细胞中NOX4蛋白表达增加。(L)

rhIL11或rmIL11刺激的小鼠肝细胞中NOX4的蛋白质免疫印迹。(M)NOX4表达的蛋白质免疫印迹和(N)在IgG和X209处理的APAP刺激的人肝细胞(20mM)中GSH水平。(O)GKT-13781对rhIL11刺激的人肝细胞GSH水平和CASP3激活的剂量依赖性抑制作用。siNOX4对rhIL11诱导的(P)ERK、JNK和CASP3激活和(Q)人肝细胞GSH耗竭水平的影响。(I-Q)rhIL11/rmIL11(10ng ml^{-1}除非另有说明),APAP(20mM),IgG/x209(2μg ml^{-1}),siNT(非靶向siRNA对照)/siNOX4(50nM)。(I-K,M-Q)原代人肝细胞(L)原代小鼠肝细胞。(J,L-Q)24h。(C-D,G-J,N,O,Q)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图的形式显示。(C-D,G-H)双尾Student's t-检验;(I-J)双尾邓尼特检验;(N,O,Q)双尾,Tukeyx校正的Student's t-检验。

[0439] 图12A至12H.示意图、图像和图形显示肝细胞特异性IL11RA1缺失保护小鼠免受APAP诱导的肝损害。(A)$IL11RA1^{loxP/loxP}$小鼠中APAP损伤诱导示意图。$IL11RA1^{loxP/loxP}$小鼠静脉注射AAV8-ALB-Null(对照组)或AAV8-ALB-Cre(CKO)以在肝细胞中特异性删除IL11RA1。病毒给药后3周,过夜禁食的对照和CKO小鼠注射APAP(400mg kg^{-1})或生理盐水。ALB:白蛋白。(B)典型的肝脏大体解剖和(C)来自生理盐水和APAP注射的对照和CKO小鼠的H&E图像(标尺,500μm)。(D)血清ALT水平,(E)血清AST水平,(F)肝脏GSH水平,(G)IL11RA、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK、Cl.CASP3、CASP3和GAPDH的蛋白质免疫印迹,以及(H)促炎基因的相对肝脏mRNA表达水平。(D-F、H)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图表示;Sidak校正的Student's t-检验。

[0440] 图13A至13L.示意图、图像和图形显示用抗IL11Ra抗体和/或NAC治疗APAP引起的肝损害。(A)APAP OD小鼠抗IL11RA(X209)预防性给药示意图;X209或IgG(10mg kg^{-1})在禁食期开始时,即APAP(400mg kg^{-1})注射前16h给药;对照小鼠接受生理盐水注射。(B)血清ALT水平,(C)如图13A所示实验的代表性的H&E图像(标尺,500μm)和肝GSH水平。(E)抗IL11RA(X209)剂量寻找实验示意图;X209(2.5-10mg kg^{-1})或IgG(10mg kg-1)在注射APAP后3h给药小鼠。(F)血清ALT水平(生理盐水的值与5B中所用的相同),(G)肝脏GSH水平,和(H)肝ERK和JNK激活的蛋白质免疫印迹,如图13E所示的实验。(I)示意图显示了X209和N-乙酰半胱氨酸(NAC,500mg kg^{-1})单独使用或与X209联合使用(5mg kg^{-1})的治疗比较。隔夜禁食小鼠在APAP注射后3h用IgG、NAC或NAC+X209处理,数据显示在(J-L)。NAC、NAC+X209处理对(H)血清ALT水平(I)肝脏GSH水平,以及(J)p-ERK、p-JNK和Cl.CASP3表达水平的影响。(B,C,F,G,J,K)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图表示;双尾,Tukey校正的Student't-检验。

[0441] 图14A至14K.示意图,图像和图形显示后期抗IL11RA治疗的肝再生和肝衰竭逆转。(A)APAP损伤小鼠的后期治疗剂量示意图。隔夜禁食小鼠APAP后10h给药IgG/X209(20mg kg^{-1})。(B)代表性的肝脏大体解剖学,(C)代表性的H&E染色肝脏图像(标尺,500μm),(D)血清I111水平,(E)血清ALT水平,(F)p-ERK、p-JNK、Cl.CASP3、PCNA、Cyclin D1/D3/E1和p-RB的蛋白质免疫印迹,(G)来自接受后期X209剂量(APAP后10h)的APAP小鼠的代表性EdU染色肝脏图像(标尺,100μm),如图14A所示。(H)蛋白质免疫印迹显示NAC或NAC+X209处理的APAP小鼠肝脏中PCNA,Cyclin D1/D3/E1,p-RB蛋白表达水平(图13G)。(I)在致死APAP OD(550mg kg^{-1})后10h小鼠接受X209(20mg kg^{-1})治疗的示意图,数据显示在(J-K)。(J)致死APAP OD后10h用IgG或X209治疗的小鼠的生存曲线。(K)对照组(D8)、IgG(24h)和X209处理小鼠(D8)的

大体肝脏解剖。(D,E)数据为均数±SD;2-way ANOVA;(J)Gehan-Breslow-Wilcoxon检验。

[0442] 图15.与I111-荧光素酶敲入小鼠的产生有关的示意图。使用CRISPR/Cas9将Kozak-Luciferase-WPRE-polyA敲入位于IL11外显子1的策略。土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调节元件(WPRE)。

[0443] 图16.与IL11-EGFP敲入小鼠的产生有关的示意图。将A-EGFP盒敲入IL11基因第5外显子的策略,取代TGA终止密码子导致I111-2A-EGFP蛋白的翻译。2A接头被切断,导致EGFP在表达和分泌IL11的细胞中滞留。

[0444] 图17A和17B.散点图显示IL11肝毒性作用。(A)增加rhIL11和(B)存在IgG或X209(2 μg ml^{-1})时的APAP刺激的人原代肝细胞的碘化丙啶(PI)染色代表性的流式细胞术前向散射图。

[0445] 图18A至18F.图像、图形和表格显示了人或小鼠IL11对人或小鼠肝细胞的物种特异性影响。(A)重组人IL11(rhIL11,10ng ml^{-1}或重组小鼠IL11(rmIL11,10ng ml^{-1})对人肝细胞ERK、JNK和CASP3的激活状态的影响。(B)rhIL11(10ng ml^{-1})或增加的rmIL11剂量(1,5,10,15和20ng ml^{-1})刺激的人肝细胞上清液中ALT水平。(C)rhIL11和rmIL11单独治疗(图10C)或(D)APAP给药(图10F)对小鼠血清AST水平的影响;对于每个时间段(6h,24h),从左到右的箱分别对应于生理盐水、rmIL11和rhIL11治疗。(E)小鼠IL11RA与小鼠IL11或人IL11相互作用以及人IL11RA与人IL11相互作用的结合亲和力和动力学常数。(F)蛋白质免疫印迹显示rhIL11对rmIL11(10ng ml^{-1},24h)刺激的小鼠肝细胞p-ERK、ERK、p-JNK、JNK的抑制作用呈剂量依赖性,(B)数据显示为均值±SD;(C,D)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图的形式显示。(B)双尾,Tukey校正的Student't-检验;(C)双尾Student't-检验;(D)双尾邓尼特检验。FC:倍数变化。

[0446] 图19A至19E.图形和图像显示肝细胞特异性IL11过度表达导致肝脏坏死炎症。对照和IL11-Tg小鼠(图11A)的(A)心、肺、肾重量(B)血清AST水平,(C)门静脉直径的量化,(D)总ERK、总JNK和CASP3蛋白免疫印迹,以及(E)促炎标志物的相对肝脏mRNA表达水平。(A-C、E)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图表示;双尾Student't-检验。

[0447] 图20A至20D.图像和图形显示只有物种特异性的IL11诱导肝细胞中的NOX4和谷胱甘肽耗竭。rhIL11和rmIL11(10ng ml^{-1})对(A)NOX4蛋白表达,(B)人肝细胞中GSH水平,(C)小鼠肝细胞GSH水平的影响。(D)给药小鼠(图10C)rhIL11或rmIL11后肝脏GSH水平;对于每个时间段(6h,24h),从左到右的箱分别对应生理盐水、rmIL11和rhIL11处理。(B-D)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图表示;双尾邓尼特检验。

[0448] 图21A和21B.图形显示了重组人IL11(rhIL11)恢复受损的小鼠肝脏中GSH水平。(A)rhIL11对rmIL11刺激的小鼠原代肝细胞GSH水平的剂量依赖性抑制作用;双尾,Tukey校正的Student't-检验。(B)rhIL11或rmIL11对APAP损伤后小鼠肝脏GSH水平的影响,如图10F所示;双尾邓尼特检验。对于每个时间段(6h、24h),从左到右的箱分别对应生理盐水、rmIL11和rhIL11处理。(A、B)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱),和最小-最大值(须)的须图的形式显示。

[0449] 图22A和22B图像和图形显示NOX4抑制剂GKT-137831防止IL11的肝毒性作用。NOX4抑制剂GKT-137831对(A)ERK和JNK激活和对(B)rhIL11(10ng ml^{-1},24h)刺激的人肝细胞的

ALT分泌的剂量依赖性抑制作用。(B)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图显示;双尾,Tukey校正的Student't-检验。FC:倍数变化。

[0450] 图23A和23B.图像和图形显示NOX4对IL11的肝毒性作用至关重要。(A)蛋白质免疫印迹显示了siNOX4的敲低效率。(B)siNOX4对rhIL11诱导的原代人肝细胞死亡和ALT释放的影响。(A-B)rhIL11(10ng ml^{-1}),siNT(非靶向siRNA对照)/siNOX4(50nM);24h;数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图显示;双尾,Tukey校正的Student't-检验。FC:倍数变化。

[0451] 图24A和24B.图形显示对照和CKO小鼠在给予APAP后24h有相似的APAP和APAP-谷胱甘肽血清水平。LC-MS/MS定量(A)APAP和(B)APAP-谷胱甘肽在对照和CKO小鼠血清中的含量。数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图显示;双尾Student't-检验。

[0452] 图25A至25C.图表形显示抗IL11Ra抗体(X209)降低APAP损伤后血清AST。(A)在APAP前16h(图13A),接受预防剂量的X209(10mg kg^{-1})的生理盐水和APAP小鼠的血清AST水平。(B)在APAP给药后3h,X209对接受治疗剂量X209的APAP小鼠血清AST水平的剂量依赖性影响(图13D,生理盐水的值与S11A中使用的相同)。(C)APAP损伤后3h,单独使用NAC(500mg kg^{-1})或与X209(5mg kg^{-1})联合使用治疗的小鼠的血清AST水平(图13G)。(A-C)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图显示;双尾,Tukey校正的Student't-检验。

[0453] 图26A和26B.图形显示APAP OD后24h,小鼠血清中APAP和APAP-谷胱甘肽水平。APAP给药24h后,(A)APAP和(B)APAP-谷胱甘肽在生理盐水对照小鼠、以及IgG和X209处理小鼠的LC-MS/MS定量。数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图显示;双尾,Tukey校正的Student't-检验。

[0454] 图27A和27B.图形和图像显示X209逆转APAP所致的肝损害。(A)血清AST水平和(B)蛋白质免疫印迹显示逆转实验组小鼠肝脏总ERK、JNK、CASP3和RB的含量,如图14A所示。

[0455] 图28A和28B.图像和图形显示了X209治疗的小鼠在给予致死剂量的APAP后的恢复。(A)IgG(APAP后24h)和X209治疗的小鼠(APAP后第8天)肝脏的代表性H&E图像(标尺,500μm)。(B)生理盐水对照和X209治疗的小鼠(APAP后第8天)血清ALT水平。

[0456] 图29.IL11在APAP诱导的肝毒性中的设想的机制和作用示意图。肝内代谢APAP通过NAPQI产生ROS,并触发IL11分泌。肝细胞上的自分泌IL11信号环并通过NOX4继续产生ROS,其驱动细胞持续死亡并限制肝脏再生,独立于APAP及其代谢物。如果IL11通路在基因上或治疗上被阻断,肝细胞死亡就可以被阻止,肝再生就可以恢复。

[0457] 图30A和30B.箱式图显示,在APAP过量前16小时给予抗IL11治疗可防止急性肝损伤。给小鼠腹腔注射20mg/kg抗IL11抗体(ENx203)或IgG对照抗体后16小时,给药严重过量的APAP(400mg/kg)。24小时后对小鼠实施安乐死。(30A)血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和(30B)门冬氨酸转氨酶(AST)作为与急性肝损害及肝细胞死亡有关的相关事件被测定。

[0458] 图31A至31K.与IL-11和IL-6受体表达及IL-11和IL-6信号传导作用有关的散点图、箱线图、直方图和图像。(31A)肝细胞IL11RA、IL6R和gp130染色的代表性流式细胞术前向散射(FSC)和荧光强度图。(31B)根据RNA-seq(左)和Ribo-seq(右)(百万分之一转录本,TPM),肝细胞中IL11RA1和IL6R的丰度在基线读取。(31C和31D)基于人肝细胞RNA-seq和

Ribo-seq(n＝3)的(31C)IL11RA1和(31D)IL6R转录产物度数覆盖度。(31E和31F)(31E)蛋白质免疫印迹显示在一定剂量范围内的hyperIL11或hyperIL6刺激后ERK、JNK和STAT3激活状态和(31F)肝细胞分泌的ALT。(31G)单用hyperIL11或在存在增加的可溶性gp130(sgp130)的情况下刺激的肝细胞上清液中的ALT水平。(31H和31I)肝细胞裂解物的蛋白免疫印迹显示(31H)磷酸化ERK和JNK及其各自的总表达对单独或与sgp130一起的hyperIL11刺激的反应,以及(31I)磷酸化STAT3和总STAT3对有或没有sgp130刺激的hyperIL6的反应。(31J)在sgp130或可溶性IL11RA(sIL11RA)存在下,IL11刺激的肝细胞的碘化丙啶(PI)染色的代表性FSC图。(31K)蛋白免疫印迹显示p-ERK、p-JNK及其各自在肝细胞中的总表达对IL11单独刺激或在存在sgp130或sILRA的情况下的响应。(31A-31K)原代人肝细胞;(31E-31K)24小时刺激;(31E-31K)hyperIL11、hyperIL6、IL11(20ng/ml)、sgp130、sIL11RA(1μg/ml)。(31B,31F-31G)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图显示。

[0459] 图32A至32H.与IL-11和IL-6受体表达及IL-11和IL-6信号传导作用有关的散点图、箱线图、直方图和图像和图形。(32A)活化的THP-1细胞的IL11RA、IL6R和gp130染色的代表性FSC图。(32B)基于RNA-seq和Ribo-seq的原代人肝细胞gp130转录本(百万分之一转录本,TPM)。(32C)基于人原代肝细胞RNA-seq和Ribo-seq的gp130转录本读取覆盖度(n＝3)。(32D)原代人肝细胞和活化的THP-1细胞中IL11RA、IL6R、gp130和白蛋白表达的免疫荧光图像(标尺,100μm)。(32E)肝细胞中可溶性IL6R的基线水平。(32F)在sgp130或sIL11RA存在下,IL11刺激的原代人肝细胞(PI+VE细胞)的PI染色定量。(32G)在1μg/ml的sgp130或sIL11RA存在下,增加IL11浓度对原代人肝细胞分泌ALT水平的剂量依赖性影响。(32H)增加sgp130或sIL11RA浓度对IL11诱导的ALT分泌的剂量依赖性影响。(32B,32G-32H)数据以中间值(中线)、25-75百分位数(箱)和最小-最大值(须)的须图显示;(32E-32F)数据显示为均值±SEM;(32F-32H)Tukey校正的Student't-检验。

实施例

[0460] 在以下实施例中,发明人证明IL-11直接损害肝细胞存活,并且抗IL-11治疗可以改善肝毒性。本发明人证明了DILI前给药的IL-11拮抗剂保护肝细胞死亡和保护肝功能的能力,还表明DILI后给药的IL-11拮抗剂可以逆转肝损害症状和恢复肝功能。

[0461] 实施例1:IL-11对肝细胞的影响

[0462] 为探讨IL-11对肝细胞的影响,采用原代人肝细胞进行细胞培养实验。

[0463] 人肝细胞(5200,ScienCell)在37℃和5％CO_2条件下生长和维持。添加2％胎牛血清和1％青霉素-链霉素的肝细胞培养基(5201,ScienCell),每2～3天更新一次,用标准胰蛋白酶法将细胞在80％汇合度时传代。所有实验都在低细胞传代(P2-P3)下进行,在无血清肝细胞培养基中进行相应的刺激(24小时)之前,血清饥饿细胞16小时。将受刺激的细胞与未受刺激的细胞进行比较,未受刺激的细胞在相同条件下生长相同时间(无血清肝细胞培养基),但未受刺激。

[0464] 免疫荧光染色法检测人肝细胞IL-11Rα的表达。人肝细胞在染色前24小时接种在8孔室玻片上(每孔1.5×104个细胞)。细胞在4％PFA中固定20分钟,用PBS洗涤,非特异性位点用封闭缓冲液(含5％BSA的PBS)封闭2小时。细胞与抗IL-11Rα抗体[EPR5446](ab125015,Abcam,1:100)孵育过夜(4C),然后与山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor488)(ab150077,

Abcam,1:200)孵育1小时。在黑暗中干燥载玻片小室,并在载玻片上加入5滴带有DAPI的封固剂15分钟,然后用荧光显微镜(Leica)成像。阴性对照样品除抗IL-11Rα抗体孵育步骤外,同样处理。

[0465] 通过测定IL-11剂量范围(0.019～10ng/ml)处理后肝细胞上清液中丙氨酸转氨酶(ALT)的水平来检测IL-11介导的肝细胞死亡。采用ALT活性测定试剂盒(ab105134,Abcam)根据制造商的步骤测定ALT水平。罗丹明-鬼笔环肽染色检测IL-11刺激后24h应激纤维的并发数。

[0466] 研究了活性氧(ROS;过氧化氢(0.2mM H_2O_2,24h,31642,Sigma)刺激)对原代人肝细胞的影响。

[0467] 结果如图1A至1C所示。发现IL-11可直接损害肝细胞存活率。

[0468] 发现原代人肝细胞高表达IL-11Rα受体(1A)。发现IL-11刺激会诱导剂量依赖性肝细胞死亡,这可以通过生理相关剂量范围内丙氨酸转氨酶(ALT)的逐渐增加来证明(1B)。此外,在剂量范围内,IL-11逐渐刺激肝细胞中肌动蛋白应激纤维的增加(1B;来自不同剂量范围的显微照片),这反映了已知导致肝细胞功能障碍的肝细胞部分上皮向间充质转化(Grant Rowe等人。分子与细胞生物学2011;31(12):2392-2403)。

[0469] 因为已知APAP可诱导ROS依赖的肝损伤,我们用H_2O_2刺激人肝细胞并发现IL-11在上清中上调10倍(1C)。因此,IL-11直接导致肝细胞死亡,并驱使肝细胞进入功能失调的部分上皮-间充质细胞转换(EMT)状态,这已知限制了肝脏的再生能力(Grant Rowe等人,见上文)。

[0470] 实施例2:抗IL-11治疗对肝毒性的影响

[0471] 采用对乙酰氨基酚(APAP)诱导的小鼠肝损伤模型,研究抗IL-11治疗对肝毒性的影响。

[0472] 该动物程序是根据SingHealth机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准和进行的。给所有小鼠提供随意的食物和水,除非在饥饿时期。

[0473] 简单地说,将12-14周龄雄性小鼠饥饿,在APAP(A3035,Sigma)(腹腔,400mg/kg)注射前16小时腹腔注射(IP)抗IL-11Rα抗体10mg/kg或IgG同种型对照。APAP给药后24小时处死小鼠。

[0474] 根据制造商的说明,分别采用小鼠IL-11DuoSet(DY418和DY008,R&D系统)和人IL-11Quantikine ELISA试剂盒D1100,R&D系统)分别定量小鼠血清和肝细胞上清中IL-11的水平。

[0475] 取肝样本,室温10％中性缓冲福尔马林(NBF)固定48h,脱水,石蜡块包埋,7μm切片。切片按标准方法用苏木精伊红(H&E)染色,光学显微镜检查。

[0476] 结果如图2A至2E所示。图2A显示了治疗方案的示意图。

[0477] 如上图所示,APAP毒性后发现血清IL-11显著升高(2B),均值±SD,对照,n＝2;APAP,n＝3。接受单剂量抗IL-11Rα抗体治疗的小鼠被发现ALT水平显著降低(与IgG对照组相比降低55％;2C),即显著降低肝损害的程度。发现抗IL-11治疗也可以防止APAP引起的肝脏质量损失,这反映了肝细胞的破坏,相较于IgG对照抗体的肝脏质量损失为24％(肝脏指数;2D)。(E)肝脏组织学的H&E染色显示IgG治疗小鼠肝小叶中心严重坏死,这是APAP毒性的典型组织学特征,发现抗IL11Rα治疗可减轻这种情况。

[0478] APAP处理后24h观察IgG对照或抗IL-11Rα抗体治疗小鼠的移动性和活动度。发现对照IgG治疗的小鼠静止/临近死亡,有明显的健康不良特征(如毛发直立、驼背姿势),而抗IL-11Rα抗体治疗的小鼠移动性和活动度正常。

[0479] 因此,通过阻断IL-11Rα来抑制IL-11信号传导可以防止APAP诱导的肝损伤(DILI)的可接受的平移模型中的肝毒性。

[0480] 实施例3:拮抗IL-11介导的信号传导保护肝细胞免受药物诱导的细胞死亡体外分析IL-11介导的信号传导拮抗对肝细胞存活力的影响

[0481] 人肝细胞(5200,ScienCell)在37℃和5%CO_2条件下,在添加2%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的肝细胞培养基(5201,ScienCell)中培养。每2-3天更换一次培养基,用标准胰蛋白酶法将细胞以80%汇合传代。所有实验均在低细胞传代(P2-P3)下进行。细胞在在用于实验前在无血清肝细胞培养基中培养,血清饥饿细胞16小时。

[0482] 在第一个实验中,在不存在(基线,BL)或存在拮抗剂抗IL11Ra抗体(X209,2μg/ml)或同型匹配IgG对照抗体(IgG,2μg/ml)的情况下,用终浓度为20mM的APAP(A3035,Sigma)处理肝细胞24小时。

[0483] 然后用FITC膜联蛋白V/死细胞凋亡试剂盒(V13242,赛默飞世尔)按照制造商的说明对肝细胞进行染色,并用BD LSRFortessa流式细胞仪(BD生物科学)对膜联蛋白V-FITC/PI染色的细胞进行流式细胞术分析。每个样本分析10,000个细胞。使用FlowJo(第7版)软件对数据进行分析。

[0484] 结果如图3所示。发现用IL-11介导的信号传导拮抗剂抗体抑制剂处理肝细胞可以显著降低死亡肝细胞的比例。

[0485] 在一个独立的实验中,在不存在(基线,BL)或存在拮抗剂抗IL11Ra抗体(X209,2μg/ml)或同型匹配IgG对照抗体(IgG,2μg/ml)的情况下,用终浓度为10mM的APAP(A3035,Sigma)处理肝细胞24小时。

[0486] 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(赛默飞科学)的放射免疫沉淀试验(RIPA)缓冲液从肝细胞中制备蛋白质提取物,然后离心澄清裂解液。用Bradford法(伯乐)测定蛋白质浓度。用SDS-PAGE分离等量的蛋白裂解物,转移到PVDF膜上,对指示的第一抗体(ERK、pERK、pJNK)进行免疫印迹分析。蛋白质用ECL检测系统(Pierce)和适当的第二抗体进行可视化。

[0487] 结果如图4所示。发现APAP处理肝细胞可显著提高p-ERK和pJNK水平(比较BL与IgG)。发现用IL-11介导的信号传导的拮抗剂抗体抑制剂处理肝细胞可以显著降低p-ERK和pJNK的水平(比较IgG与X209)。

[0488] 实施例4:拮抗IL-11介导的信号传导保护药物性肝损伤

[0489] 12～14周龄雄性小鼠腹腔注射20mg/kg拮抗剂抗IL11Ra抗体(X209)或同型匹配IgG对照抗体16h后,腹腔注射严重过量的APAP(400mg/kg)或等体积生理盐水。

[0490] APAP施用后24小时,对小鼠实施安乐死。采用ALT活性测定试剂盒(ab105134,Abcam),按照制造商的说明,测定血清ALT水平,收获肝脏,室温10%中性缓冲福尔马林(NBF)固定48h,脱水,石蜡块包埋,7μm切片。切片按标准方法用苏木精伊红(H&E)染色,光学显微镜检查。

[0491] 结果如图5A和5B所示。用IL-11介导的信号传导的拮抗剂抗IL-11Rα抗体抑制剂预处理被证明可以显著保护小鼠免受DILI相关的肝功能抑制,由血清ALT水平的显著降低所

确定(图5A)。与IgG处理的对照的肝脏相比,用IL-11介导的信号传导拮抗剂抗体抑制剂预处理的小鼠肝脏也显示出明显较少的肝细胞坏死(图5B)。

[0492] 在进一步的实验中,12-14周龄雄性小鼠腹腔注射给药20mg/kg拮抗剂抗IL11抗体(X203)或同种型匹配的IgG对照抗体16小时后,通过腹腔注射施用严重过量的APAP(400mg/kg)。

[0493] APAP给药24h后,用ALT活性(ab105134,Abcam)和AST(ab105135,Abcam)试剂盒,按照制造商的方法,测定小鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平。

[0494] 结果如图30A和30B所示。用IL-11介导的信号传导的拮抗性抗IL-11抗体抑制剂进行预处理显示出显著保护小鼠免受DILI相关的肝功能抑制,通过血清ALT和AST水平的显著降低所证明。

[0495] 实施例5:药物性肝损伤后IL-11介导的信号传导拮抗逆转肝损害症状和恢复肝功能

[0496] 12-14周龄雄性小鼠腹腔注射严重过量的APAP(400mg/kg)或等体积生理盐水,10小时后腹腔注射20mg/kg的拮抗剂抗IL11Ra抗体(X209)、同种型匹配IgG对照抗体或不处理。

[0497] 小鼠分别于24、36、48h实施安乐死。如实施例4所述分析血清ALT水平。如实施例4所述,收获肝脏并固定,并拍摄数字照片。

[0498] 结果如图6A和6B所示。在严重APAP过量后10小时给予IL-11介导的信号传导拮抗剂抗体抑制剂,显示小鼠的肝脏大体形态恢复至小鼠未用APAP处理时的状态(图6A)。在严重APAP过量后10小时给予IL-11介导的信号传导的拮抗抗体抑制剂被进一步证明可以使小鼠免受DILI相关的肝功能抑制,由血清ALT水平的显著降低所确定(图6B)。

[0499] 对从小鼠肝脏制备的蛋白质提取物也进行了蛋白质免疫印迹。肝组织在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(赛默飞科技)的放射免疫沉淀试验(RIPA)缓冲液中匀浆,随后用SDS-PAGE分离裂解物并用蛋白质分析,如实施例3所述。

[0500] 结果如图7所示。APAP过量显著上调p-ERK、pJNK1和pJNK2水平(比较对照与10h)。随后用IL-11介导的信号传导拮抗剂抗体抑制剂治疗显著降低了p-ERK、pJNK1和pJNK2的水平(比较IgG与X209)。

[0501] 在进一步的实验中,12-14周龄雄性小鼠腹腔注射致死过量的APAP(550mg/kg)或等体积生理盐水,10小时后腹腔注射20mg/kg的拮抗剂抗IL11Ra抗体(X209)、同种型匹配IgG对照抗体或不处理。

[0502] 在APAP/生理盐水给药后8天监测小鼠的存活情况,结果如图8A所示。与IgG处理的对照相比,用IL-11介导的信号传导拮抗剂抗体抑制剂治疗显著提高了施用致死剂量的APAP小鼠的存活率。

[0503] 小鼠分别于24小时和192小时(8天)实施安乐死。如实施例4所述分析血清ALT水平。如实施例4所述,收获肝脏并固定,并拍摄数字照片。

[0504] 结果如图8B和8C所示。在致死性APAP过量后10小时给予IL-11介导的信号传导拮抗剂抗体抑制剂,显示在8天后小鼠的肝脏大体形态恢复至未用APAP处理的小鼠大体形态(图8B)。在致死性APAP过量后10小时给予IL-11介导的信号传导的拮抗剂抗体抑制剂被进一步证明可以从DILI相关的肝功能抑制中拯救小鼠;8天后,血清ALT水平与正常(生理盐水

给药)对照小鼠的水平没有显著差异(图8C)。

[0505] 肝毒性损伤后10小时施用IL-11介导的信号传导拮抗剂逆转DILI相关的肝毒性和防止严重/致死APAP过量受试者死亡的能力是一个真正显著的结果。小鼠用药过量后10小时被认为相当于人类用药过量后约24小时。

[0506] 结果表明,拮抗IL-11介导的信号传导是一种非常有希望的治疗策略,可以减少肝毒性损伤后的肝损伤和相关的发病率/死亡率。

[0507] 实施例6:药物性肝损伤后IL-11介导的信号传导拮抗逆转肝损害症状和恢复肝功能

[0508] 6.1概述

[0509] 对乙酰氨基酚(APAP)过量是肝衰竭的主要原因。在APAP诱导的小鼠肝损伤(AILI)模型中,给药重组人白细胞介素11(rhIL11)具有保护作用。

[0510] 本研究表明,rhIL11在小鼠AILI中的有益作用是由于外源rhIL11对内源性小鼠IL11活性的意外抑制作用。与公认的范式相反,IL11是由受损的肝细胞分泌的,以驱动凋亡和抑制肝再生。

[0511] 肝细胞特异性IL11表达小鼠自发发展为肝损害,而那些IL11RA1删除的被有力地保护免受AILI。在致死APAP过量后10小时给予垂死小鼠中和抗IL11R抗体,导致其存活率为90%。

[0512] 本公开的数据推翻了误解,指示了疾病机制并确定了治疗靶点。

[0513] 6.2引言

[0514] 对乙酰氨基酚(N-acetyl-p-aminophenol,APAP)是一种非处方药止痛药,常因过量(OD)导致APAP诱导的肝损伤(AILI),是急性肝衰竭的主要原因(1)。抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)对早期出现的患者有益(2),但在OD后8小时内没有基于药物的治疗,如果不能进行肝移植,可能会导致死亡(3,4)。

[0515] 在肝细胞中,APAP被代谢为N-乙酰基-对-苯甲酰亚胺(NAPQI),它耗尽细胞谷胱甘肽(GSH)水平,破坏线粒体蛋白,导致活性氧(ROS)产生和JNK激活(5)。ROS相关的JNK激活导致坏死、凋亡和其他形式的肝细胞死亡的组合,导致肝衰竭(1,6,7)。JNK和ASK1抑制剂在小鼠模型中对AILI有部分保护作用,但这尚未转化到临床(8,9)。

[0516] 从普罗米修斯的故事开始,肝脏再生就一直吸引着人类,而且可以说是非常深刻的,就像在啮齿动物和人类的部分肝脏切除术后所看到的那样(10,11)。然而,在AILI环境下,肝再生持续受到抑制,导致永久性损伤和患者死亡。靶向阻碍肝脏超常再生能力的途径可能触发自然再生,这在AILI(12,13)中可能特别有用。

[0517] 白细胞介素11(IL11)是一种很少被研究的细胞因子,它对心肌成纤维细胞的激活和心脏、肾脏、肺和肝脏的纤维化至关重要(14-16)。已知IL11是由损伤的肝细胞分泌的,IL11在AILI小鼠模型的血清中可以检测到高水平的表达,其表达被认为是代偿性的和细胞保护性的(17)。在此基础上,给药重组人IL11(rhIL11)可有效地治疗AILI小鼠模型,并对肝缺血、内毒素血症或炎症有保护作用(17-22)。最近就在2016年,rhIL11被提议作为AILI患者的治疗方法(23)。

[0518] 在肝纤维化的研究中,发明人意外地观察到,在一些纤维炎症性肝病模型的背景下,IL11可能对肝细胞功能有害(14)。这一与先前文献的明显差异促使发明人更详细地观

察IL11对肝细胞的影响而不是纤维化,他们选择在AILI的小鼠模型中这样做,其中IL11在很大程度上被上调(17)。

[0519] 6.3IL11驱动APAP诱导的肝细胞死亡

[0520] 正如以前报道的(17),AILI被证实以损伤小鼠的IL11血清水平升高为特征(图9A)。发明人随后设法解决了小鼠AILI模型中IL11血清水平升高是否起源于肝脏。APAP诱导肝细胞IL11转录本的强烈上调(35倍,P<0.0001)。荧光素酶被克隆到IL11起始密码子的报告小鼠的生物发光成像指示IL11在整个肝脏中表达(图9B和9C,以及图15)。蛋白质印迹证实在AILI的一个时间过程中,IL11在蛋白水平上调(图9D)。使用第二个报告鼠的实验,该报告鼠将EGFP报告构建体插入到IL11的3'UTR中(图16),显示APAP后,IL11蛋白在坏死的小叶中心肝细胞中高表达,这是AILI的病理特征,与裂解的caspase3(Cl.CASP3)同时发生(图9E)。

[0521] 在体内确定了AILI中I111上调的来源后,发明人进行了体外实验研究潜在机制的实验。原代人肝细胞暴露于APAP导致IL11的剂量依赖性分泌(图9F)。肝细胞表达白细胞介素11受体亚单位α(IL11RA),并且已知IL11在某些细胞类型中激活ERK(14),因此发明人探索了IL11对ERK和JNK的影响,这在AILI中是重要的,在肝细胞中激活。IL11诱导晚期(>6h)和持续的ERK和JNK激活,与CASP3裂解同时发生(图9G)。基于FACS的分析显示了剂量依赖性的IL11诱导的肝细胞死亡(图9H和图17A)。为了探索IL11信号传导在APAP攻击肝细胞中的作用,发明人使用IL11RA中和抗体(X209)(14),该抗体抑制CASP3裂解和细胞死亡,以及ERK和JNK激活(图9I和9J,图17B)。虽然这些数据证实了IL11在AILI中的上调,但它们挑战了这种作用在受损肝脏中是代偿性和保护性的普遍看法。

[0522] 6.4重组人IL11的物种特异性效应

[0523] rhIL11一直被报道在啮齿类动物肝损伤模型中具有保护作用(17-20,23),然而实施例6.3中描述的结果表明rhIL11在体外对人类肝细胞具有完全相反的作用(图9)。这促使发明人去测试rhIL11蛋白在用于外来物种时潜在的不一致性,因为人类和小鼠IL11只有82%的蛋白序列同源性。首先,他们比较了rhIL11和重组小鼠IL11(rmIL11)对小鼠肝细胞的影响。种属匹配的rmIL11刺激小鼠肝细胞ERK和JNK磷酸化,并诱导CASP3分裂,而rhIL11没有作用(图10A)。同样,当rmIL11诱导小鼠肝细胞死亡时,rhIL11则不。事实上,在较高剂量下,rhIL11有抑制小鼠肝细胞死亡的趋势(图10A)。在人类肝细胞的相应实验中,发明人发现rhIL11刺激ERK和JNK信号和肝细胞死亡,而rmIL11不刺激(图18A和18B)。

[0524] 这表明IL11信号传导在肝细胞死亡中的作用在物种间是保守的,但重组IL11蛋白具有物种特异性作用,在外来物种中不激活该信号传导通路。这个假说通过在体内给小鼠注射rmIL11或rhIL11被测试(图10C)。rmIL11的注射导致逐渐的ERK和即刻的JNK激活。相反,rhIL11对ERK或JNK磷酸化没有影响(图10D)。注射rmIL11也引起肝损害,并伴有ALT和AST升高(图10E和图18C)。与此形成鲜明对比的是,注射rhIL11后24h,天然小鼠的ALT和AST水平略有降低(ALT,P=0.018;AST,P=0.0017)。

[0525] 为了追踪rhIL11对小鼠的潜在保护作用,进行了一项类似于2001(20)的AILI研究的方案,在APAP OD后将rhIL11注射到小鼠体内(图10F)。这证实了rhIL11降低了小鼠AILI的严重程度(降低:ALT,52%,P=0.0001;AST,39%,P<0.0001),而种属匹配的rmIL11对小鼠无保护作用(图10G和图18D)。rhIL11的治疗效果伴随着肝脏ERK和JNK激活的降低(图

10H),这表明rhIL11阻断了肝脏中IL11驱动的信号传导通路,类似于IL11RA抗体(图9I)。

[0526] 利用表面等离子体共振(SPR)发现rhIL11与小鼠白细胞介素11受体α链1(mIL11RA1)结合,其KD为72nM,略强于rmIL11:mIL11RA1相互作用(94nM),并与先前报道的rhIL11:hIL11RA(50nM)接近,这一结果得到了再次证实(图10I和图18E)(24)。发明人随后进行竞争ELISA分析,发现rhIL11与rmIL11竞争结合mIL11RA1,并且是一种非常有效的阻断剂,如对mIL11RA1更高的亲和力所示(图10J)。在小鼠肝细胞中,rhIL11是rmIL11诱导的信号通路和细胞毒活性的有效的、剂量依赖性的抑制剂(图10K和10L,图18F)。因此,矛盾的是,外源rhIL11在体外和体内均充当小鼠IL11的中和剂,这些观察对理解IL11在肝损伤和更广泛的疾病中的作用提出了挑战。

[0527] 6.5肝细胞特异性表达IL11引起自发性肝衰竭

[0528] 为了在体内检测小鼠肝细胞分泌内源性IL11的作用,通过用编码白蛋白启动子驱动的Cre构建体的AAV8病毒注射ROSA26$^{IL11/+}$小鼠,IL11转基因在肝细胞中被特异性表达(15,16)(IL11-Tg小鼠,图11A)。转基因诱导后3周,IL11-Tg小鼠肝脏严重异常并变小(38%,P<0.0001),伴有血清ALT和AST水平升高,而其他器官未受影响(图11A至11D和图19A和19B)。组织学上,有明显的门静脉扩张和血液在窦内堆积-提示窦阻塞综合征-以及门静脉三联体周围浸润(图11E和图19C)。对I111-Tg肝脏的分子分析揭示了ERK、JNK和CASP3裂解的激活以及促炎基因表达的增加(图11F和图19D和19E)。因此,肝细胞分泌IL11,如APAP毒性所见(图9),是肝毒性的。

[0529] 6.6IL11促进NOX4介导的活性氧生成

[0530] APAP驱动的JNK激活在体外需要IL11信号(图9I和9J),已知这是随着ROS的产生和GSH的耗竭而发生的。检测了IL11-Tg小鼠的肝脏GSH水平,并发现减少(62%,P<0.0001),表明IL11信号传导-直接或间接-诱导ROS(图11G)。

[0531] 在成纤维细胞中,NOX4(一种NADPH氧化酶和ROS的来源)的表达与IL11表达相关(15,25),肝细胞特异性NOX4缺失阻止JNK的病理激活(26)。因此,发明人更详细地研究了IL11、NOX4和ROS之间的关系。在IL11-Tg小鼠中,肝NOX4表达上调(图11H)。在原代人肝细胞中,IL11在一段时间内刺激剂量依赖性GSH耗竭,其反映ERK和JNK激活,并伴有NOX4上调(图9G和图11I-11K)。如预期的那样,只有物种特异性的IL11诱导NOX4上调并降低GSH水平(图11L和图20A至20D)。

[0532] APAP刺激还导致肝细胞NOX4上调,与肝细胞GSH水平耗竭同时发生,这被抗IL11RA抗体X209阻断(图11M和11N)。发明人重新考虑了rhIL11在抑制内源性IL11诱导的小鼠肝细胞死亡中的作用(图10J和10K),并发现rhIL11在恢复rmIL11刺激的小鼠细胞中GSH水平方面具有明显的剂量依赖性作用(图21A)。类似地,rhIL11恢复了APAP诱导的小鼠GSH耗竭,而rmIL11没有(图21B)。GKT-13781是一种特殊的NOX4抑制剂,以剂量依赖的方式阻止了IL11刺激的GSH耗竭、CASP3激活和细胞死亡(图11O和图22A和22B)。用siRNA证实了NOX4药理抑制的特异性,从而防止了IL11诱导的肝毒性(图11P和11Q,图23A和23B)。这些数据表明,IL11刺激的NOX4活性,也可以影响线粒体ROS,对在AILI的背景下的GSH耗竭很重要。

[0533] 6.7肝细胞特异性缺失IL11RA1防止APAP引起的肝衰竭

[0534] 为了在成年小鼠肝细胞中特异性删除L11RA1,L11RA1条件性敲除(CKO)是通过将AAV8-ALB-Cre病毒注射到LoxP侧翼Il11ra1等位基因纯合子小鼠以及野生型对照而产生

的。病毒感染后3周,对照组小鼠和CKO给予APAP(400mg kg^{-1})(图12A)。APAP给药后的第二天,大体解剖显示对照组小鼠肝脏小而变色,而CKO小鼠肝脏看起来正常(图12B)。组织学显示正常小鼠典型的广泛小叶中心坏死,在CKO中未观察到(图12C)。

[0535] 引人注目的是,CKO小鼠的ALT和AST水平分别比对照组低99%和95%,而GSH水平与基线相似。两组血清中APAP和APAP-谷胱甘肽(APAP代谢物)水平相似,因此IL11RA1缺失不影响APAP代谢(图12D至12F,图24A和24B)。在对照组小鼠中观察到ERK和JNK的激活,但在CKO中没有观察到(图12G)。肝细胞中该受体的缺失也显著降低了炎症标志物,提示AILI的炎症继发于实质损伤。(图12H)。总之,这些数据表明肝细胞特异性IL11信号传导在AILI的发病机制中起主导作用。事实上,肝细胞IL11RA1缺失足以保护APAP OD的发生,提示血清中游离可溶性I111RA1或其他细胞来源的受体脱落不通过反式信号传导促进疾病的发病。

[0536] 6.8早期抗IL11Ra给药在APAP诱导的肝损伤中的作用

[0537] 发明人接下来测试通过给药抗IL11RA(X209)抗体(14),治疗性抑制IL11信号传导是否有效地减轻AILI。最初,通过在APAP前16h注射X209或对照抗体(10mg kg^{-1})进行预防性治疗。这种方法降低了70%以上的血清肝损害标志物,大大恢复了肝脏GSH水平,并限制了小叶中心坏死的组织学证据(图13A至13D和图25A)。

[0538] 接下来,通过在APAP后3h给予抗体,以治疗相关的模式给予抗IL11RA治疗,这是APAP代谢和毒性建立的时间点,此后大多数干预措施在AILI小鼠模型中没有效果(图13E)(9)。X209在不同剂量范围内(2.5-10mg kg^{-1})抑制AILI,并在肝损伤标志物和肝GSH水平上有剂量依赖性的改善。JNK和ERK激活的减少证实了剂量依赖性靶标覆盖度(图13F至13H和图25B)。

[0539] 最后,在APAP给药后3h,确定与目前的护理标准、NAC结合使用时,抑制IL11信号传导是否有附加值(图13I)。单独给药NAC可降低血清ALT和AST水平。然而,NAC联合X209甚至比单独使用NAC或X209更有效(ALT降低:NAC,38%,P=0.0007;X209,47%,P<0.0001;NaC+x209,75%;P<0.0001)(图13F、13J和图25C)。在分子水平上,NAC或NAC与X209一起抑制ERK和JNK的程度反映了血清中ALT降低和肝脏GSH水平恢复的程度(图13K和13L)。因此,抗IL11RA治疗与目前的护理标准相结合时会增加益处。

[0540] 6.9抗IL11Ra治疗肝再生

[0541] 对于APAP OD后8h或更晚出现在急诊室的患者,没有有效的治疗方法。这促使我们在小鼠给药APAP(400mg kg^{-1})后10h检测抗IL11RA(图14A)。鉴于APAP在小鼠体内的加速代谢,该模型中10h的治疗相当于APAP OD后24h人的治疗。通过质谱法对血清中的APAP和APAP-谷胱甘肽进行定量,发现与生理盐水处理的对照组相比水平升高,实验组之间的水平相当,正如预期的那样(图26A和26B)。大体解剖学、组织学和血清IL11、ALT和AST水平分析表明,X209在APAP后第二天能显著逆转肝损伤,而IgG治疗小鼠则有严重和持续的肝损伤(图14B-14E和图27A)。在整个实验过程中,治疗性抗体有效地阻断了ERK和JNK的激活,这在24h时导致裂解的CASP3减少(图14F和图27B)。

[0542] 促进肝再生的干预措施具有很大的潜力,可能为AILI的治疗提供一种新的手段(12)。因此,对肝再生重要基因的地位进行了评估(10)。IL11信号传导的抑制与强大的再生特征相关,PCNA、细胞周期蛋白D1/D3/E1的强烈上调和RB的磷酸化,如部分肝切除术后再生过程中所见(10)。EdU注射和组织学分析显示,与对照组相比,X209治疗的小鼠有大量的细

胞核,并有近期DNA合成的证据(图14G)。重新评估APAP后3小时给予X209的影响(图13I至13L),以观察再生是否与早期IL11信号传导抑制有关。事实证明是这样,X209和NAC的结合比单独使用NAC更有效地增加了再生的分子标记,尤其是对细胞周期蛋白D1和D3(图14H)。

[0543] 最后,X209(20mg kg^{-1})在更高且致死的对乙酰氨基酚剂量(550mg kg^{-1})后10小时,此时小鼠垂死且肝脏正在经历暴发性坏死性炎症(图14I)。到研究结束时,X209治疗的小鼠恢复并有90%的存活率。相反,IgG治疗的小鼠在48h内没有恢复和死亡,死亡率为100%(图14J)。在致死剂量的APAP后的第8天,X209治疗的小鼠看起来健康,肝脏形态正常,ALT水平与未接受APAP的对照组相当(图14K和图28A和28B)。

[0544] 6.10讨论

[0545] APAP OD是常见的,在英国,每年有多达5万人进入急诊科,其中一些人发展为肝功能衰竭,需要移植(1)。在此,IL11,其先前被报道在APAP诱导的肝衰竭(17,20)、肝缺血(18,21)、内毒素血症(22)和炎症(19)中具有保护作用,显示它实际上是肝毒性的,对APAP OD后的肝衰竭至关重要。

[0546] 内源性IL11具有肝毒性的观察是最令人惊讶的,因为超过30篇文章报道了rhIL11在人类疾病的啮齿类动物模型中的细胞保护和/或抗炎作用(表1和表2)。rhIL11被证明是小鼠IL11与IL11RA1结合的竞争性抑制剂,这推翻了之前对IL11在AILI和肝病中作用的更普遍的理解。这也意味着抗IL11治疗可能对其他疾病有效,其中rhIL11在小鼠模型(如类风湿性关节炎(27)和结肠炎(28)等(表2))中有保护作用。基于错误的假设,即rhIL11在小鼠中的作用体现了有益的IL11功能增益,许多使用rhIL11的临床试验在患者中进行(表3)。

[0547]

表1.显示重组人 IL11 (rhIL11) 在啮齿动物肝损伤模型中的保护作用的出版物清单	
Yu等人，2016.“白细胞介素-11保护小鼠肝脏免受热缺血/再灌注（WI/RP）损伤”，肝病和胃肠病学临床与研究40（5）：562-70	在体内，Wi/RP损伤前给药rhIL11(500 μg/kg，IV) 保护小鼠肝脏。在体外，rhIL11(2 μg/ml，12h)预处理可减少由于缺氧/再灌注的小鼠肝细胞凋亡。
Zhu等人，2015.“IL-11通过STAT3信号通路减轻小鼠肝脏缺血/再灌注损伤(IRI)”，PloS One 10(5):e012629。	在IRI前1小时单次注射rhIL11（500μg/kg，IP）的小鼠中rhIL11的肝保护作用。在体外，小鼠肝细胞用1 μg/ml的rhIL11处理。
Nishina等人，2012.“白细胞介素-11与氧化应激和代偿性增殖有关”，Science Signaling 5（207）：ra5。	在对乙酰氨基酚 (APAP) 注射前2小时给予rhIL11受体超激动剂 (NT-3N, 500μg/kg) 可减少小鼠的急性肝损伤。
Maeshima等人，2004.“白细胞介素11对急性内毒素血症肝损伤的保护作用”，Shock 21（2）：134-38。	作者得出结论，rhIL11 (150 μg/kg, IP) 在LPS诱导的大鼠肝损伤（急性内毒素血症）中发挥重要保护作用。
Trepicchio等人，2001.“rhIL-11在对乙酰氨基酚诱导的肝毒性小鼠模型中的保护作用”，Toxicologic Pathology 29（2）：242-249。	作者指出rhIL11（250 或 500 μg/kg，SC）对对乙酰氨基酚引起的肝损伤具有保护作用，其中在对乙酰氨基酚给药前2小时向小鼠注射rhIL11。
Bozza等人，1999.“白细胞介素-11减少小鼠T细胞依赖性实验性肝损伤”，Hepatology 30（6）：1441-47。	在刀豆蛋白A诱导的T细胞介导的肝毒性之前2小时施用rhIL11 (50-500μg/kg, IP) 可减少小鼠的肝坏死并提高存活率。

[0548]

表2.显示rhIL11在其他啮齿动物疾病模型中的保护和/或抗炎作用的出版物列表

肠	*Gibson等人，2010.“白细胞介素-11减少TLR2缺陷小鼠中TLR4诱导的结肠炎，并恢复肠道STAT3信号传导”，Gastroenterology 139（4）：1277-88。*	作者报告说，给予 rhIL11（5 μg/kg，IP）可改善感染性结肠炎，并且对TLR2缺陷小鼠具有细胞保护作用。
	Boerma等人，2007.“局部给予白细胞介素-11改善大鼠肠道辐射损伤”，Cancer Research 67（19）：9501-6。	作者得出结论，IL11可改善早期肠道放射损伤，其中大鼠在照射前2天至照射后2周每天注射rhIL11 (2 mg/kg/d)。
	Opal等人，2003.“口服重组人白细胞介素-11对实验性中性粒细胞性脓毒症有保护作用”，传染病杂志 187（1）：70-76。	作者认为，IL11在环磷酰胺的细胞还原性化疗过程中能够维持上皮细胞的完整性，这是基于每天口服rhIL11(0.5mg/kg/天）的大鼠所观察到的作用，从首次给药环磷酰胺前1天开始，共12天。
	Ropeleski等人，2003.“白细胞介素-11诱导的热休克蛋白25可使肠上皮特异性细胞保护免受氧化应激”，Gastroenterology 124（5）：1358-68。	作者得出结论，IL11在肠上皮损伤过程中具有上皮特异性的细胞保护作用。大鼠、小鼠和犬细胞系(IEC-18、YAMC、NIH3T3、MDCK-HR)均被高水平(50-100ng/ml)的rhIL11刺激。
	Greenwood-Van Meerveld等人，2000.“重组人白细胞介素-11调节小肠和结肠的离子转运和黏膜炎症”，实验室调查；技术方法与病理学杂志 80（8）：1269-80。	作者得出结论，在肠道炎症过程中，IL11作为上皮转运的调节剂或抗炎细胞因子发挥作用，这是基于rhIL11对大鼠粘膜片（10-10000 ng/ml）和大鼠（33μg/kg，1周或2周交替天）的影响。
	Du等人，1997，“白介素-11在小鼠缺血性肠坏死模型中的保护作用”，美国生理学杂志-胃	rhIL11(250 μg/kg/天）在肠缺血诱导前3天和后7天给药对缺血性肠坏死有保护作用，作者建议将其作为胃肠粘膜疾病的治疗方

[0549]

表2.显示rhIL11在其他啮齿动物疾病模型中的保护和/或抗炎作用的出版物列表

	肠和肝脏生理学。	法。
	Orazi等人，1996.“白细胞介素-11在联合化疗和放疗的小鼠中阻止细胞凋亡，加速小肠黏膜的恢复”，实验室调查；技术方法与病理学杂志 75（1）：33-42。	给药rhIL11(250 μg/kg)促进小鼠小肠粘膜从化疗和辐射损伤中恢复。
	Potten等人，1996.“通过用白细胞介素 11 预处理保护小肠克隆性干细胞免受辐射诱导的损伤也增加了小鼠的存活时间”,Stem Cells. 199614(4):452-9。	RhIL11(100 μg/kg，SC)，在细胞毒暴露前后给药小鼠，可保护肠隐窝中的克隆生成细胞，并增加小鼠在辐射暴露后的存活时间。
	Qiu等人，1996.“重组人白细胞介素-11对实验性TNB诱导的大鼠结肠炎的保护作用”，消化系统疾病与科学 41(8):1625-30。	作者描述了rhIL11对三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎的保护作用。大鼠在TNB给药前3天每天注射rhlL11(100、300或1000 μg/kg，SC)，或在TNB给药后3-7-14天每天注射rhlL11(100、300或1000 μg/kg，SC)。
	Du等人，1994.“骨髓基质细胞衍生的生长因子白介素-11可刺激小肠黏膜细胞消融治疗后的恢复”，血液 83（1）：33-37。	给药rhIL11(250 μg/kg/d，SC)可促进小鼠放疗和化疗联合后小肠黏膜的恢复。
心脏	*Tamura等人，2018.“白细胞介素-11对心脏供体模型的缺血再灌注损伤的保护作用”，心胸外科年鉴 7（1）：99-105。*	给药rhIL11(18 μg/ml，IV，收集心脏前10分钟）能有效地保护冷缺血离体模型后大鼠的心功能，降低细胞凋亡指数。
	Obana等人，2012.“IL-11 的治疗性给药通过心脏中的 STAT3 表现出对缺血再灌注损伤的后处理作用”，美国生理学杂志，	给药rhIL11（20 μg/kg，再灌注开始时静脉注射）可防止小鼠缺血再灌注损伤诱导的急性心肌梗死后不良心脏重塑和细胞凋亡

[0550]

表2.显示rhIL11在其他啮齿动物疾病模型中的保护和/或抗炎作用的出版物列表		
	心脏与循环生理学 303（5）：H569–77。	
	Obana等人，2010.“白细胞介素-11对信号传导和转录激活因子3的治疗性激活可改善心肌梗死后的心脏纤维化”，Circulation 121（5）：684-91。	在左冠状动脉结扎诱发的心肌梗塞(MI)后24小时施用rhIL11 (8μg/kg, IV)，然后每24小时连续施用4天，可减少小鼠MI后瘢痕体积。
	Kimura等人，2007.“鉴定心肌细胞为白介素11的靶点，白介素11是一种心脏保护细胞因子”，细胞因子 38（2）：107-115	作者根据在心脏缺血再灌注前15小时给予小鼠的rhIL11(8μg/kg)的作用得出结论，IL11是一种心脏保护剂
免疫系统	*Bozza等人，2001.“白细胞介素-11调节活化的CD4 T细胞产生Th1/Th2细胞因子”，干扰素与细胞因子研究杂志 21(1):21-30。*	作者指出，IL11直接作用于激活的小鼠CD4+VE T细胞，调节而不是抑制rhIL11(1-500ng/ml)刺激后的免疫应答。
	Opal等人，2000.“重组人白细胞介素 11 具有抗炎作用，但不会加剧全身性李斯特菌感染”，传染病杂志 181（2）：754-756	在李斯特菌感染前7天每天给药rhIL11(150 mg/kg，IV)可降低干扰素-γ水平。有趣的是，作者指出抗IL11mAb(10mg/kg)治疗后，炎症标志物IL-6/IFN-γ呈下降趋势。
	Hill等人，1998.“白细胞介素-11促进T细胞极化，预防异基因骨髓移植后急性移植物抗宿主病”，临床研究杂志 102（1）：115-23。	作者根据将高剂量rhIL11（250μg/kg，SC，每天两次）注射到GVHD小鼠模型中的实验得出结论，IL11通过T细胞极化防止移植物抗宿主病(GVHD)。
	Soni等人，1997.“白介素11对5-氟尿嘧啶所致仓鼠溃疡性粘膜炎连续病程的缓解作用”，细胞因子 9（8）：605-12。	给药rhIL11(50-100μg/动物/天，SC)可保护仓鼠免受5-氟尿嘧啶诱导的仓鼠溃疡性黏膜炎。

[0551]

表2.显示rhIL11在其他啮齿动物疾病模型中的保护和/或抗炎作用的出版物列表

	*Trepicchio*等人，*1997.*“*IL-11*通过抑制核因子-κB来调节巨噬细胞效应功能”，免疫学杂志*159*（*11*）：*5661-70*。	作者得出结论，IL11抑制巨噬细胞分泌促炎细胞因子；用rhIL11 (10-100 ng/ml) 处理鼠原代巨噬细胞。
	*Trepicchio*等人，*1996.*“重组人*IL-11*通过下调促炎性细胞因子的释放和一氧化氮的产生来减弱炎症反应”，免疫学杂志 *157*（*8*）：*3627-34*。	作者报道IL11可降低LPS处理小鼠血清和LPS刺激的巨噬细胞培养基中TNF-α、IL-1β和IFN-γ的水平。用rhIL11(分别为500μg/kg或10～100ng/ml)处理小鼠和小鼠巨噬细胞。
关节	*Anguita*等人，*1999.*“白细胞介素-*11*在鼠莱姆病中的选择性抗炎作用：关节炎减少而心脏炎持续存在”，传染病杂志 *179*（*3*）：*734-37*。	给药rhIL11(0.1-2 μg/小鼠/天，5天/周，连续3周）可减少伯氏疏螺旋体感染小鼠（莱姆病小鼠模型）的关节炎，但不减少心脏炎症。
	*Walmsley*等人，*1998.*“白介素-*11*在已建立的小鼠胶原诱导的关节炎中的抗炎作用”，免疫学 *95*（*1*）：*31-37*。	rhIL11每日给药(0.3-100μg/小鼠/天，IP，10天）可减轻胶原诱导关节炎小鼠模型的炎症反应。
肾脏	*Lee*等人，*2012.*“白细胞介素-*11*可防止肾脏缺血和再灌注损伤”，美国生理学杂志，肾生理学 *303*（*8*）：*F1216–24*。	作者根据rhIL11和聚乙二醇化rhIL11（100-1000μg/kg，IP）对小鼠的预处理（IR前10分钟）和治疗后（IR后30-60分钟）的作用得出结论，IL11具有肾脏保护作用。
	*Stangou*等人，*2011.*“*IL-11*对*Wistar*京都大鼠的肾毒性肾炎肾小球*TGF-β*和细胞外基质表达的影响”，肾病学杂志 *24*（*1*）：*106-111*。	肾毒性肾炎前2小时给予rhIL11(800-1360μg/kg，IP),然后每天1次，连续6天，可抑制ECM在大鼠体内的沉积。
肺	*Sheridan*等人，*1999.*“白细胞介素-*11*可减轻内毒素所致肺损伤的肺部炎症和血管舒缩功能障	作者认为，rhIL11(200mg/kg,IP）具有抗炎作用，对LPS所致的大鼠肺损伤和致死有一定的保护作用

表2.显示rhIL11在其他啮齿动物疾病模型中的保护和/或抗炎作用的出版物列表

	碍”，美国生理学杂志 277（5）：L861–67。	
[0552]	*Waxman等人，1998.“白细胞介素-11的靶向肺表达增强了小鼠对100%氧的耐受性，并减少了高氧诱导的DNA断裂”，J. Clin. Invest.101(9)：1970-1982*	根据小鼠肺特异性人IL11过表达的影响，作者得出结论IL11可防止高氧诱导的肺损伤。

表3.来自临床试验的出版物列表，其中向患者施用 rhIL11，主要基于推断的rhIL11 在啮齿动物疾病模型中使用的保护作用。

Herrlinger等人，2006.“皮下注射重组人白细胞介素-11与泼尼松龙治疗活动性克罗恩病的随机双盲对照试验”，美国胃肠病学杂志 101（4）：793-797。	对51例活动性克罗恩病患者给予RhIL11(1mg，每周一次持续12周，SC)治疗，发现其疗效明显低于泼尼松龙治疗。
[0553] *Lawitz等人，2004.“对抗病毒治疗无效的慢性丙型肝炎和晚期肝病患者白细胞介素-11的初步研究”，美国胃肠病学杂志 99（12）：2359-64。*	对20例慢性丙型肝炎和晚期肝病患者给药RhIL11(5μg/kg，每天给药12周，SC）。研究结束时观察到较低的血清ALT。最常见的副作用是下肢水肿，这在所有受试者中都被观察到。
Sands等人，2002.“重组人白细胞介素-11在活动性克罗恩病患者中的随机对照试验”，消化药理学和治疗学 16（3）：399-406。	对49例克罗恩病患者给药rhIL11(15μg/kg，每周一次，连续6周，SC)。与安慰剂相比，接受rhIL11的患者获得缓解的比例更大。观察了包括水肿在内的副作用。
Moreland等人，2001.“重组人白细胞介素 11 (rhIL-11) 治疗活动性类风湿性关节炎受试者的 I/II 期随机、掩蔽、安慰剂对照试验的结果”，关节炎研究 3（4）：247-252。	在类风湿性关节炎患者中每周给药 15μg/kg rhIL11 持续12周(SC)是安全的，但没有观察到治疗益处。此外，60.6%接受rhIL11的患者在注射部位出现轻度不良反应（红斑伴有/不伴有硬结）。

[0554] *Trepicchio等人，1999.“白细胞介素-11治疗选择性下调银屑病皮损中的I型细胞因子促炎通路”，临床研究杂志 104（11）：1527-1537。*	患有广泛性银屑病的患者接受了2.5或5mg/kg rhIL11（每天给药8周，SC）治疗。在12名患者的亚组 (n=7) 中观察到应答（炎症标志物的RNA表达）；其他5名患者没有反应，也没有观察到改善。

[0555] 发明人提出了一种完善的APAP毒性机制,即NAPQI损伤线粒体产生ROS,其刺激

IL11依赖的NOX4上调,并进一步维持ROS的产生(图29)。这导致了双重病理:通过JNK和caspase激活杀死肝细胞和阻止肝细胞再生,通过尚未明确的机制。AILI的小鼠模型与人类疾病非常相似,因此靶向IL11信号传导的治疗有望用于APAP诱导的肝毒性患者的治疗。由于IL11中和疗法不依赖于改变APAP代谢(图12F),并特异性地刺激组织再生,它们比目前的护理标准有效得多,可能对急诊室晚就诊的患者特别有用。

[0556] 6.11实施例6的材料和方法

[0557] 抗体

[0558] 裂解的caspase3(9664,CST)、caspase3(9662,CST)、细胞周期蛋白D1(55506,CST)、细胞周期蛋白D3(2936,CST)、细胞周期蛋白E1(20808,CST)、p-ERK1/2(4370,CST)、ERK1/2(4695,CST)、GAPDH(2118,CST)、GFP(ab6673,Abcam)、IgG(Adevron)、p-JNK(4668,CST)、JNK(9258,CST)、中和抗IL11RA(X209,Aldevron;体内研究)、IL11RA(130920,圣克鲁斯;WB)、NOX4(110-58849,Novus Biologicals)、PCNA(13110,CST)、p-RB(8516,CST)、RB(9313,CST)、抗兔HRP(7074,CST)、抗鼠HRP(7076,CST)、抗兔Alexa Fluor488(ab150077,Abcam)、抗兔Alexa Fluor647(ab150079,Abcam)、抗鼠Alexa Fluor488(ab150113,Abcam)、抗山羊Alexa Fluor488(ab150129,Abcam)。

[0559] 重组蛋白质

[0560] 重组人IL11(rhIL11,UniprotKB:p20809,Genscript),重组小鼠IL11(rmIL11,UniprotKB:P47873,Genscript),人IL11RA(10252-H08H,SinoBiological),小鼠IL11RA(50075-M08H,SinoBiological)。

[0561] 化学制品

[0562] 对乙酰氨基酚(APAP,A3035,西格玛)、DAPI(D1306,赛默飞世尔科技)、D-荧光素(L6882,西格玛)、GKT-137831(17764,开曼化学公司)、N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC,A7250,西格玛)。

[0563] LC-MS/MS试剂

[0564] 参考标准对乙酰氨基酚(APAP,P030000,西格玛),内标(IS)对乙酰氨基酚-D4(APAP-D4,A161222,多伦多研究化学公司),IS对乙酰氨基酚谷胱甘肽(APAP GLUT,A161223,多伦多研究化学公司),乙腈(900667,西格玛),甲酸铵(A115-50,西格玛),甲酸(F0507,西格玛),小鼠血清(IGMSCD1SER50ML,i-DNA生物技术)。所有化学物质、试剂和溶剂均为LC-MS级质量。

[0565] 动物模型

[0566] 动物程序是根据SingHealth机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准和进行的。除禁食期外,所有小鼠均随意提供食物和水,在禁食期间仅随意提供水。

[0567] 对乙酰氨基酚中毒小鼠模型

[0568] 在APAP之前,12-14周龄雄性小鼠(C57BL6/NTAC,除非另有说明)禁食过夜。然后通过腹膜内(IP)给药给予小鼠严重(400mg kg-1)或致死(550mg kg-1)剂量的APAP。如上文或图例中所述,在不同时间和以不同剂量向小鼠施用抗IL11RA(X209)或IgG同种型对照抗体。小鼠在APAP后的不同时间点被安乐死,从10小时到8天,如上文或图例中所述。

[0569] IL11-荧光素酶小鼠

[0570] 小鼠IL11基因由5个外显子组成,ATG起始密码子在第1外显子,TGA终止密码子在

第5外显子。小鼠IL11的三个转录本已确定(ENSMUSG00000004371):转录本IL11-201是最长的,编码199aa前肽,而转录本IL11-202和IL11-203包含一个替代的第一外显子,并都被预测编码一个缺乏信号肽的更短的140aa同种型。利用CRISPR/Cas9技术,引入一个Kozak-Luciferase-WPRE-polyA序列,替换了IL11-201(ENSMUST00000094892.11)第1外显子的ATG起始密码子,导致此特定转录本的翻译中断。将在外显子1中具有识别位点的单向导RNA(sgRNA)连同Cas9和含有Kozak-荧光素酶-WPRE-polyA序列的靶向构建体显微注射到受精的受精卵中,然后转移到假孕小鼠体内(上海模型生物中心)。通过测序验证荧光素酶盒插入到Il11基因座中。突变的Il11-荧光素酶后代在C57BL/6背景上产生,并通过基因分型进行鉴定以检测荧光素酶构建体在外显子1中的插入,使用扩增对应于野生型Il11等位基因的818bp区域的引物(5'-GGAGGGAGGGGACGCCAATGACC-3'(SEQ ID NO:22)和5'-TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG-3'(SEQ ID NO:23)),以及第二组引物,其扩增对应于含有荧光素酶构建体的靶向等位基因的928bp区域(5'-AATTCCGTGGTGTTGTCG-3'(SEQ ID NO:24)和5'-TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG-3'(SEQ ID NO:25))。

[0571] 杂合的Il11-荧光素酶如上所述受到APAP诱导的肝损伤。24小时后,小鼠腹膜内注射150mg kg^{-1}D-荧光素的PBS溶液,随后根据制造商的说明使用IVIS Lumina系统(Perkin Elmer)获取肝脏的生物发光图像。

[0572] Il11-EGFP小鼠

[0573] EGFP组成性敲入Il11基因的转基因小鼠由赛根生物科学公司产生。简而言之,敲入小鼠被产生以包含插入外显子5的2A-EGFP盒,该盒取代了TGA终止密码子序列,并且靶向的转录本的翻译将产生由2A自切割肽接头分隔的全长IL11前肽和EGFP。IL11基因的靶向载体同源臂,包含插入内含子4(两侧为SDA:自缺失锚定位点)的Neo盒和插入第5外显子的2A-EGFP盒,用C57BL/6文库中的BAC克隆通过PCR产生。用C57BL/6ES细胞进行基因打靶,成功地将靶向克隆注入C57BL/6白化胚胎,然后将其重新植入CD-1假孕雌性。通过毛色鉴定原种转殖基因的动物,并通过与C57BL/6雌性进行繁殖和随后对后代进行基因分型来确认种系传递。基因分型引物被设计来扩增内含子4的选定区域,跨越Neo盒SDA位点,根据以下引物序列:(5'-GAAATGAGAGCCTAGAGTCCAGAG-3'(SEQ ID NO:26)和5'-GAGGCTTGGAAGAATGCACAATTA-3'(SEQ ID NO:27))。

[0574] 肝细胞特异性Il11过表达小鼠(Il11-Tg)

[0575] 先前已经描述了将小鼠Il11 cDNA导入在loxP-Stop-loxP位点控制下的Rosa26位点以允许在Cre重组酶介导的切除后Il11的细胞类型特异性过表达的小鼠(15)。这些动物在杰克逊实验室可获得(C57BL/6N-Gt(ROSA)26SortM1(CAG-Il11)Cook/J)。为了诱导肝细胞中Il11的特异性表达,杂合的Il11-Rosa26小鼠被静脉注射(IV)PBS/小鼠(VectorBiolabs)中的$4x10^{11}$基因组拷贝的AAV8-ALB-Null(对照)或AAV8-ALB-Cre(Il11-Tg)。三周后检测肝脏和血清。

[0576] 肝细胞特异性Il11ra1缺失小鼠

[0577] 最近生成并验证了Il11ra1-floxed小鼠,其中Il11ra1基因的外显子4到7两侧是loxP位点,允许在Cre重组酶介导的切除后Il11ra1的空间和时间缺失(Ng等人,Sci Transl Med.(2019)11(511)pii:eaaw1237)。为了诱导肝细胞中Il11ra1的特异性缺失,通过尾静脉向纯合Il11ra1-floxed小鼠静脉注射AAV8-ALB-Cre病毒(PBS/小鼠中的$4x10^{11}$基因组拷贝,

VectorBiolabs)。将类似量的AAV8-ALB-Null病毒注射到纯合Il11ra1-floxed小鼠中作为对照。接受AAV8处理的小鼠在APAP损伤前恢复三周。蛋白质印迹检测肝IL11RA的敲低效率。

[0578] 细胞培养

[0579] 人和小鼠原代肝细胞均在37℃和5％CO_2条件下生长和维持。生长培养基每2-3天更新一次,细胞在80％汇合度时传代,采用标准胰蛋白酶法。所有实验均在低细胞传代(P1-P3)下进行。将受刺激的细胞与未受刺激的细胞进行比较,这些细胞在相同的条件下生长了相同的时间,但没有刺激。

[0580] 原代人肝细胞

[0581] 人肝细胞(5200,ScienCell)在添加2％胎牛血清和1％青霉素-链霉素的肝细胞培养基(520,ScienCell)中维持。细胞在相应刺激前血清饥饿16小时,如上所述或在图例中,在无血清肝细胞培养基中进行24小时。

[0582] 原代小鼠肝细胞

[0583] 将小鼠肝细胞(ABC-TC3928,AcceGen Biotech)保存在添加1％青霉素-链霉素的小鼠肝细胞培养基(ABC-TM3928,AcceGen Biotech)中。用不同的处理条件刺激细胞24h,如上文所述或图中图例所示。

[0584] siRNA转染

[0585] 转染前16h,原代人肝细胞在6孔板中以60～70％的汇合度接种。细胞转染50nm的NOX4 siRNA(ON-TARGETplus SMARTpool siRNA,L-010194-00-0005,Dharmacon)或对照siRNA(D-001810-10-05,Dharmacon)在含有脂质体酰胺RNAiMAX转染试剂(13778150,赛默飞世尔)的OptiMEM(31985070,赛默飞世尔)中37℃放置24h。然后用rhIL11刺激转染细胞24h。用NOX4免疫印迹法测定敲低效率。

[0586] 流式细胞术

[0587] 人原代肝细胞(5×10^5)用FITC膜联蛋白V/死细胞凋亡试剂盒(V13242,赛默飞世尔)根据制造商的说明进行染色。用流式细胞仪(Fortessa,BD Biosciences)对PI^{+VE}细胞进行定量,并用FlowJo(第7版)软件(TreeStar)进行分析。

[0588] 比色分析

[0589] 用ALT活性(ab105134,Abcam)和AST(ab105135,Abcam)测定试剂盒测定小鼠血清和肝细胞上清中丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的水平。肝谷胱甘肽巯基(GSH)测定采用谷胱甘肽比色检测试剂盒(EIAGSHC,赛默飞世尔)。所有比色分析都是根据制造商的方法进行的。

[0590] 酶联免疫吸附试验

[0591] 采用小鼠IL-11DuoSet(DY418和DY008,R&D系统)和人IL-11Quantikine ELISA试剂盒D1100,R&D系统)分别定量小鼠血清和肝细胞上清中IL-11的水平。

[0592] 竞争性ELISA

[0593] 小鼠IL11RA(1μg ml^{-1}于PBS中)包被在96孔板上(4℃过夜),然后用封闭缓冲液(1％BSA在含0.05％吐温20的PBS中)封闭。用Lightning-Link快速生物素A型试剂盒(Expedeon)按制造商的说明制备生物素化小鼠Il11。RhIL11或rmIl11在阻断缓冲液中连续稀释2倍(从5μg ml^{-1}开始),并与0.01μg ml^{-1}的生物素化小鼠IL11混合。将生物素化小鼠IL11与rhIL11或rmIL11的混合物加入包被板中,在室温下孵育1h。显色通过加入链霉亲和

素-HRP(1:1000的封闭缓冲液中)和TMB显色原溶液(002023,赛默飞世尔科技)进行。

[0594] 免疫印迹

[0595] 对肝细胞和肝组织裂解液进行蛋白质印迹。肝细胞和肝组织在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀(RIPA)缓冲液(赛默飞世尔)中匀浆,然后通过离心以澄清裂解液。用Bradford法(伯乐)测定蛋白质浓度。用SDS-PAGE分离等量的蛋白裂解物,转移到PVDF膜上,并对指定的一抗进行免疫印迹分析。蛋白质用ECL检测系统(Pierce)和适当的第二抗体进行可视化。

[0596] 定量聚合酶链反应(qPCR)

[0597] 用Trizol(英杰公司)从速冻的肝组织或肝细胞裂解物中提取总RNA,然后用RNeasy柱(凯杰公司)纯化。用iScript™cDNA合成试剂盒(Bio-Rad)根据制造商的说明合成cDNA。基因表达分析是在重复样本上进行的,使用TaqMan(应用生物系统)或fast SYBR green(凯杰公司)技术,使用StepOnePlusTM(应用生物系统)进行40个循环。将表达数据标准化为GAPDH mRNA表达,并使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算倍数变化。特异性TaqMan探针和SYBR green引物的序列可根据要求获得。

[0598] 表面等离子体共振(SPR)

[0599] SPR测量在BIAcore T200(GE保健公司)上进行,温度为25℃。缓冲液在使用前脱气并通过0.2μm过滤器过滤消毒。用标准胺偶联化学方法将rhIL11或rmIl11固定在羧甲基化葡聚糖(CM5)传感器芯片上。为进行动力学分析,将系列浓度(3.125nM～100nM)的人IL11RA或小鼠Il11ra的以40μL min^{-1}的流速注入rhIL11、rmIl11和参比表面。所有分析物溶于含有1mg ml^{-1}BSA的HBS-EP+(BR100669,GE保健公司)中。分别测定150s和200s的结合和解离。在每次分析物注射后,表面通过注射pH2.5的甘氨酸30s再生,随后是5分钟的稳定期。所有传感图均对齐并有双重参考。通过使用BIAevaluation v3.0软件(GE保健公司)将校正的传感图与1:1Langmuir模型拟合来确定亲和力和动力学常数。平衡结合常数KD由结合速率常数kd/ka之比确定。

[0600] 组织学

[0601] 苏木精&伊红(H&E)染色

[0602] 将肝脏在10％中性缓冲福尔马林(NBF)中室温固定48h,脱水,石蜡块包埋,以7μm切片。切片按标准方法用H&E染色,光学显微镜检查。

[0603] EdU染色

[0604] 在冷的PBS中冲洗肝脏并用无绒纸拍干并在OCT化合物(4583,Tissue-Tek®)中冷冻成型。将OCT化合物冷冻后,用铝箔包裹肝脏标本,在-80℃下保存。在使用Baseclick的EdU IV成像试剂盒488L(BCK488-IV-IM-L)根据制造商的方法进行EdU检测之前,冷冻包埋的肝脏在7μm厚度下冷冻切片(-20℃),并在载玻片上干燥1h。

[0605] 免疫荧光染色

[0606] 肝脏按上述方法处理并冷冻(EdU染色切片)。冷冻肝组织在-20℃、7μm切片,并干燥1h(室温)。肝切片先在冷丙酮中固定15分钟,然后用0.1％TritonX-100(T8787,西格玛)渗透,2.5％正常山羊血清(S-1012,Vector Labs)封闭1h(室温)。肝切片与GFP(1:500)和Caspase3(1:1000)第一抗体孵育过夜(4℃),然后与适当的Alexa Fluor488/647第二抗体(1:250)孵育1h(室温)。荧光显微镜(莱卡)显像前用DAPI染色细胞核。

[0607] LC-MS/MS

[0608] 将小鼠血清样品(20μL)、校准物和QCs转移到96深孔板中,然后加入50μL的10μg l^{-1}APAP-D4重同位素标准品。用360μL含0.1%甲酸的冰冷乙腈处理后,混合平板(rpm min^{-1},10分钟),然后离心(2270g,50分钟,4℃)。将140μL上清液小心转移到96-微孔板,并上样到自动取样器,通过LC-MS/MS分析。然后,在使用标准曲线进行定量之前,将离子计数与重同位素标准值进行归一化。生物标志物的液相色谱(LC)分离在Agilent 1290Infinity II LC系统(安捷伦科技)上进行,使用包被PEEK的SeQuant®ZIC®-cHILIC 3mm,100Å 100x2.1mm HPLC柱(默克私人有限公司)保持在40℃。有机溶剂是含有0.1%甲酸的乙腈(溶剂A),水性溶剂是20mM甲酸铵pH 4.0(溶剂B)。二元泵A(G7120A,安捷伦科技公司)上的线性LC梯度用溶剂B的百分比设置如下:在0分钟时为10%,在9分钟时为70%,在11分钟时为70%,在11.1和11.5分钟之间为10%,流速为0.4ml min^{-1}。用10%溶剂B进一步平衡柱11.5分钟。另外一个高速泵,二元泵B和一个快换阀头,2位置/10端口,1300巴(5067-4240,安捷伦)被用来通过自动交替柱再生来减少循环时间。溶剂B在二元泵B上的百分比维持在10%,流速为0.3ml min^{-1}。对于质量检测,LC洗脱液连接到安捷伦6495三重四极质谱系统(G6495A,安捷伦科技)与电喷雾源以正电离或负电离模式操作。电喷雾电离源条件如下:毛细管电压4.0kV,喷嘴电压500V,iFunnel参数高/低压RF为90V,雾化器压力60psi,气体温度290℃,鞘气温度350℃,雾化器压力为35psi,鞘气流量为12l min^{-1}。APAP和APAP-D4的多重反应监测(MRM)条件分别为152.1→110,碰撞能(CE)为16eV,碰撞加速器电压(CAV)为5V和156→114,碰撞能(CE)为8eV,CAV为5V。用于APAP-谷胱甘肽的MRM为457.1→140,碰撞能(CE)为42eV,碰撞加速器电压(CAV)为5V。

[0609] 校准和线性度

[0610] 通过用APAP和APAP-谷胱甘肽工作溶液强化无药物小鼠血清获得九点校准曲线。APAP终浓度分别为0.32、0.46、2.6、5.2、10.3、20.6、41.3、82.5和330mg l^{-1}(低QC:1.29mg l^{-1};高QC:165mg l^{-1})。APAP-谷胱甘肽的终浓度分别为0.244、0.49、0.98、1.95、3.91、7.81、15.6、62.5、125和25mg l^{-1}(低QC:1.95mg l^{-1};高QC为31.3mg l^{-1})。用加权线性最小二乘回归(1/x2)和(1/x)分别对APAP和APAP-谷胱甘肽进行线性回归,得到各分析物与IS峰面积比的标准曲线,测定的线性系数(r2)分别为0.97807145和0.99655914。在小鼠血清样品中测定的精密度和准确度如前面所述(32)。

[0611] 统计分析

[0612] 用GraphPad Prism软件(6.07版)进行统计学分析。按Dunnett(几个实验组在一个条件下比较)、Tukey(几个条件在一个实验中彼此比较)、Sidak(将两种不同基因型的几种条件进行彼此比较)对多次检验的P值进行校正。通过双向方差分析对用于比较两个不同组的两个参数进行分析。生存曲线采用Gehan-Breslow-Wilcoxon检验分析。统计学意义判断标准为$P<0.05$。

[0613] 6.12实施例6的参考文献

[0614] 1.W.Bernal,J.Wendon,急性肝衰竭,N.Engl.J.Med.370(2014),第1170-1171页。

[0615] 2.W.M.Lee,L.S.Hynan,L.Rossaro,R.J.Fontana,R.T.Stravitz,A.M.Larson,T.J.Davern2nd,N.G.Murray,T.McCashland,J.S.Reisch,P.R.Robuck,急性肝衰竭研究组,静脉N-乙酰半胱氨酸提高早期非对乙酰氨基酚急性肝衰竭的无移植生存率,

Gastroenterology.137,856-64,864.e1(2009)。

[0616] 3.H.Jaeschke,对乙酰氨基酚:患者剂量依赖性药物肝毒性和急性肝衰竭,Dig.Dis.,33,464-471(2015)。

[0617] 4.A.L.Chiew,C.Gluud,J.Brok,N.A.Buckley,对扑热息痛(对乙酰氨基酚)过量的干预,Cochrane Database Syst.,Rev.2,CD003328(2018)。

[0618] 5.S.Win,T.A.Than,J.Zhang,C.Oo,R.W.M.Min,N.Kaplowitz,对c-Jun-N-末端激酶信号在肝病病理生物学中的作用和机制的新见解,Hepatology,67,2013-2024(2018)。

[0619] 6.H.Zhang,J.Cook,J.Nickel,R.Yu,K.Stecker,K.Myers,N.M.Dean,通过反义寡核苷酸降低肝脏Fas表达可保护小鼠免受暴发性肝炎的侵害,Nat.Biotechnol.,18,862-867(2000)。

[0620] 7.R.F.Schwabe,T.Luedde,肝细胞凋亡与坏死:一个生死攸关的问题,Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.,15,738-752(2018)。

[0621] 8.B.K.Gunawan,Z.Liu,D.Han,N.Hanawa,W.a.Gaarde,N.Kaplowitz,c-Jun N-末端激酶在小鼠对乙酰氨基酚肝毒性中起主要作用,Gastroenterology.131(2006),第165-178页。

[0622] 9.Y.Xie,A.Ramachandran,D.G.Breckenridge,J.T.Liles,M.Lebofsky,A.Farhood,H.Jaeschke,凋亡信号调节激酶1抑制剂防止对乙酰氨基酚引起的肝损伤,Toxicol.Appl.Pharmacol.,286,1-9(2015)。

[0623] 10.S.Sekiya,A.Suzuki,糖原合酶激酶3β依赖性Snail降解指导正常肝再生中的肝细胞增殖,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.108,11175-11180(2011)。

[0624] 11.A.Marcos,R.A.Fisher,J.M.Ham,M.L.Shiffman,A.J.Sanyal,V.A.Luketic,R.K.Sterling,A.S.Fulcher,M.P.Posner,右叶成人到成人活体肝移植后供者和受者的肝脏再生和功能,Transplantation.,69,1375-1379(2000)。

[0625] 12.B.Bhushan,U.Apte,对乙酰氨基酚肝毒性后的肝再生:机制和治疗机会,Am.J.Pathol.189,719-729(2019)。

[0626] 13.G.K.Michalopoulos,保肝药:肝再生和正常肝组织维持,Hepatology,65,1384-1392(2017)。

[0627] 14.A.A.Widjaja,B.K.Singh,E.Adami,S.Viswanathan,J.Dong,G.A.D'Agostino,B.Ng,W.W.Lim,J.Tan,B.S.Paleja,M.Tripathi,S.Y.Lim,S.G.Shekeran,S.P.Chothani,A.Rabes,M.Sombetzki,E.Bruinstroup,L.P.M.Min,R.A.Sinha,S.Albani,P.M.Yen,S.Schafer,S.A.Cook,抑制白细胞介素11信号传导减少非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型中肝细胞死亡和肝纤维化,炎症和脂肪变性,Gastroenterology(2019),doi:10.1053/j.gastro.2019.05.002。

[0628] 15.S.Schafer,S.Viswanathan,A.A.Widjaja,W.-W.Lim,A.Moreno-Moral,D.M.DeLaughter,B.Ng,G.Patone,K.Chow,E.Khin,J.Tan,S.P.Chothani,L.Ye,O.J.L.Rackham,N.S.J.Ko,N.E.Sahib,C.J.Pua,N.T.G.Zhen,C.Xie,M.Wang,H.Maatz,S.Lim,K.Saar,S.Blachut,E.Petretto,S.Schmidt,T.Putoczki,N.Guimarães-Camboa,H.Wakimoto,S.van Heesch,K.Sigmundsson,S.L.Lim,J.L.Soon,V.T.T.Chao,Y.L.Chua,T.E.Tan,S.M.Evans,Y.J.Loh,M.H.Jamal,K.K.Ong,K.C.Chua,B.-H.Ong,

M.J.Chakaramakkil,J.G.Seidman,C.E.Seidman,N.Hubner,K.Y.K.Sin,S.A.Cook,IL-11是心血管纤维化的重要决定因素,Nature.552,110-115(2017)。

[0629] 16.S.Cook,B.Ng,J.Dong,S.Viswanathan,G.DAgostino,A.Widjaja,W.-W.Lim,N.Ko,J.Tan,S.Chothani,B.Huang,C.Xie,A.-M.Chacko,N.Guimaraes-Camboa,S.Evans,a.Byrne,T.Maher,J.Liang,P.Noble,S.Schafer,IL-11是特发性肺纤维化的治疗靶点(2018),doi:10.1101/336537,

[0630] 17.T.Nishina,S.Komazawa-Sakon,S.Yanaka,X.Piao,D.-M.Zheng,J.-H.Piao,Y.Kojima,S.Yamashina,E.Sano,T.Putoczki,T.Doi,T.Ueno,J.Ezaki,H.Ushio,M.Ernst,K.Tsumoto,K.Okumura,H.Nakano,白细胞介素-11连接氧化应激和代偿性增殖,Sci.Signal.5,ra5(2012)。

[0631] 18.M.Zhu,B.Lu,Q.Cao,Z.Wu,Z.Xu,W.Li,X.Yao,F.Liu,IL-11通过STAT3信号通路减轻小鼠肝脏缺血/再灌注损伤(IRI),PLoS One.10,e0126296(2015)。

[0632] 19.Bozza,J.L.Bliss,R.Maylor,J.Erickson,L.Donnelly,P.Bouchard,A.J.Dorner,W.L.Trepi cchio,白细胞介素-11降低小鼠T细胞依赖性实验性肝损伤,Hepatology,30,1441-1447(1999)。

[0633] 20.W.L.Trepicchio,M.Bozza,P.Bouchard,a.J.Dorner,rhIL-11在鼠对乙酰氨基酚肝毒性模型中的保护作用,Toxicol.Pathol.29,242-249(2001)。

[0634] 21.J.Yu,Z.Feng,L.Tan,L.Pu,L.Kong,白细胞介素-11对小鼠肝脏热缺血/再灌注(WI/RP)损伤的保护作用,Clin.Res.Hepatol.Gastroenterol.40,562-570(2016)。

[0635] 22.K.Maeshima,T.Takahashi,K.Nakahira,H.Shimizu,H.Fujii,H.Katayama,M.Yokoyam a,K.Morita,R.Akagi,S.Sassa,白细胞介素11在急性内毒素血症肝损伤中的保护作用,Shock.21,134-138(2004)。

[0636] 23.H.Mühl,STAT3,无菌炎症期间细胞因子驱动的组织保护的关键参数-实验性对乙酰氨基酚(扑热息痛)诱导的肝损伤的情况,Front.Immunol.7,163(2016)。

[0637] 24.K.Schleinkofer,A.Dingley,I.Tacken,M.Federwisch,G.Mu＞＞Ller-Newen,P.C.Heinrich,P.Vusio,Y.Jacques,A.Gro＞＞Tzinger,介导配体结合的人白细胞介素-11受体结构域的鉴定,可在http://www.idealibrary.com上查阅,J.Mol.Biol.306,263-274(2001)。

[0638] 25.C.P.Denton,V.H.Ong,S.Xu,H.Chen-Harris,Z.Modrusan,R.Lafyatis,D.Khanna,A.Jah reis,J.Siegel,T.Sornasse,治疗性白细胞介素6阻断逆转真皮成纤维细胞中转化生长因子β通路的激活:来自系统性硬化症faSScinate临床试验的见解,Ann.Rheum.Dis.77,1362-1371(2018)。

[0639] 26.A.Bettaieb,J.X.Jiang,Y.Sasaki,T.-I.Chao,Z.Kiss,X.Chen,J.Tian,M.Katsuyama,C.Yabe-Nishimura,Y.Xi,C.Szyndralewiez,K.Schröder,A.Shah,R.P.Brandes,F.G.Haj,N.J.Török,肝细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸还原氧化酶4调节小鼠脂肪性肝炎发展过程中的应激信号传导、纤维化和胰岛素敏感性,Gastroenterology.149,468-80.e10(2015)。

[0640] 27.M.Walmsley,D.M.Butler,L.Marinova-Mutafchieva,M.Feldmann,白介素-11在已建立的鼠胶原诱导的关节炎中的抗炎作用,Immunology.95,31-37(1998)。

[0641] 28.B.S.Qiu,C.J.Pfeiffer,J.C.Keith,重组人白细胞介素-11对实验性TNB诱导的大鼠结肠炎的保护作用,Digestive Diseases and Sciences.41(1996),第1625-1630页。

[0642] 29.Murray,X.Dong,G.J.Sawyer,A.Caldwell,J.Halket,R.Sherwood,A.Quaglia,T.Dew,N.Anilkumar,S.Burr,R.K.Mistry,D.Martin,K.Schröder,R.P.Brandes,R.D.Hughes,A.M.Shah,A.C.Brewer,NADPH氧化酶4调节同型半胱氨酸代谢并防止对乙酰氨基酚引起的小鼠肝损伤,Free Radic.Biol.Med.89,918-930(2015)。

[0643] 30.L.Hecker,R.Vittal,T.Jones,R.Jagirdar,T.R.Luckhardt,J.C.Horowitz,S.Pennathur,F.J.Martinez,V.J.Thannickal,NADPH氧化酶-4介导肺损伤的肌成纤维细胞活化和成纤维反应,Nat.Med.15,1077-1081(2009)。

[0644] 31.P.J.Wermuth,F.A.Mendoza,S.A.Jimenez,转化生长因子-β诱导的组织纤维化在NOX4基因缺失的小鼠中的废除,Lab.Invest.99,470-482(2019)。

[0645] 32.T.Gicquel,J.Aubert,S.Lepage,B.Fromenty,I.Morel,液相色谱-串联质谱法定量分析小体积血浆中对乙酰氨基酚及其主要代谢物,分析毒理学杂志,37(2013),第110-116页。

[0646] 实施例7:人原代肝细胞IL-11和IL-6受体的表达及信号传导

[0647] 7.1引言

[0648] IL11是白细胞介素6(IL6)细胞因子家族的成员,与IL6一样,与膜结合的α受体(IL11RA)和糖蛋白130(gp130)结合,以顺式进行信号传导。IL6本身已与肝功能有关,并且有出版物表明其总体上是有益的(Klein等人,2005;Kroy等人,2010;Matthews等人,2010;Schmidt-Arras和Rose-John,2016;Wuestefeld等人,2003)。然而,也有人认为IL6可以与可溶性IL6受体(sIL6R)结合,并以反式进行信号传导,这被认为是不适应的(Schmidt-Arras和Rose-John,2016)。IL11可能与IL6一样,在反式中以致病模式发出信号,但迄今为止的实验并未在肿瘤或生殖组织中发现这方面的证据(Agthe等人,2017;Balic等人,2017)。

[0649] 7.2结果

[0650] 发明人首先通过流式细胞术评估了IL6R、IL11RA和gp130在原代人肝细胞中的表达水平。大部分细胞被观察到IL11RA和gp130的强烈表达(分别为92.6%和91.9%),但只有少数肝细胞(3.0%)表达IL6R,且水平较低(图31A和32A)。根据此结果,RNA-seq和Ribo-seq研究发现IL11RA和gp130在肝细胞中有高表达和活跃翻译。相比之下,观察到很少的IL6R转录本,几乎没有检测到IL6R翻译(图31B-31D、32B和32C)。肝细胞免疫荧光染色证实了Ribo-seq数据的结果:IL11RA高表达,但未检测到IL6R表达(图32D)。发明人也没有在培养基中检测到显著水平的IL6R(水平刚刚高于检测下限),因此他们排除了IL6R被脱落的可能性(图32E)。总之,这些数据表明IL6R在原代人肝细胞中的表达水平非常低,暗示在这些细胞中IL6顺式信号传导的作用有限。然而,这些细胞显示了IL11RA和gp130的强烈共表达。

[0651] 鉴于人肝细胞缺乏IL6R表达,发明人使用了合成的IL6反式信号传导构建物超级IL6(hyperIL6),以激活这些细胞中的IL6信号传导,并将其与合成的IL11反式信号传导复合物(hyperIL11)进行比较。HyperIL11与IL11本身一样(参见实施例6),以剂量依赖性方式(2.5ng/ml至20ng/ml)激活ERK和JNK。相比之下,IL6反式信号传导不激活非经典信号传导通路,而是剂量依赖性地诱导STAT3激活(图31E)。因此,IL11或IL6在与肝细胞gp130结合

时,与它们的同源受体形成的合成复合物激活了不同的细胞内通路,这是一个新颖而有趣的发现。

[0652] HyperIL11在原代人肝细胞培养液中引起丙氨酸转氨酶(ALT)的剂量依赖性增加,而hyperIL6(20ng/ml)被发现具有虽然有限但显著的细胞保护作用(倍数变化(FC)=0.9;P=0.0468)(图31F)。可溶性gp130(sgp130)是一种通过gp130起作用的反式信号传导复合物的抑制剂(Schmidt-Arras和Rose-John,2016)。与已报道的诱饵效应一致,sgp130阻断hyperIL11(p-ERK/p-JNK)和hyperIL6(p-STAT3)下游信号通路的激活,并抑制hyperIL11的肝毒性效应(图31G-31I)。

[0653] 然后,发明人进行实验以检测在没有人工蛋白复合物hyperIL6或HyperIL11时的IL-11反式信号传导。在可溶性gp130(sgp130,以抑制假定的反式信号传导)或可溶性IL11RA(sIL11RA,以增强假定的反式信号传导)存在下用IL11刺激细胞。sgp130或sIL11RA不影响IL11诱导的肝细胞死亡和信号传导(图31J-31K和32F)。此外,IL11剂量依赖性地(0.625ng/ml至20ng/ml)引起肝细胞死亡,而加入sgp130(1μg/ml)或sIL11RA(1μg/ml)对此无影响(图32G)。相互地,增加剂量的sgp130或sIL11RA对IL11刺激的肝细胞ALT释放没有影响(图32H)。这些数据表明,在缺乏合成构建体的情况下,IL11反式信号传导可能不存在。

[0654] 7.3实施例7的材料和方法

[0655] 抗体

[0656] 白蛋白(ab207327,Abcam),Alexa Fluor488二抗(ab150077,Abcam),p-ERK1/2(4370,CST),ERK1/2(4695,CST),gp130(PA5-28932,赛默飞世尔),IL6(AF506,R&D系统),IL6R(流式细胞术,ab222101,Abcam),IL6R(用于免疫荧光染色,MA1-80456,赛默飞世尔),IL11(Aldevron),IL11RA(流式细胞术和免疫荧光染色,ab125015,Abcam),IL11RA(蛋白质印迹,130920,圣克鲁兹),p-JNK(4668,CST),JNK(9258,CST),p-STAT3(4113,CST),STAT3(4904,CST),小鼠HRP(7076,CST),兔HRP(7074,CST)。

[0657] 重组蛋白质

[0658] 商业重组蛋白质:人hyperIL6(IL6R:IL6融合蛋白,8954-SR,R&D系统),人可溶性gp130 Fc(671-GP-100,R&D系统),人IL11RA(8895-MR-050,R&D系统)。定制重组蛋白:人IL11(UniprotKB:P20809,Genscript)。人hyperIL11(IL11RA:IL11融合蛋白)模拟反式信号传导复合物,使用IL11RA片段(氨基酸残基1-317;UniprotKB:Q14626)和IL11(氨基酸残基22-199,UniprotKB:P20809)与20个氨基酸的接头(SEQ ID NO:20;Schafer等人,2017)构建。

[0659] 化学品

[0660] 多聚甲醛(PFA,28908;赛默飞世尔),佛波醇12-肉豆蔻酸13-乙酸酯(PMA,P1585,西格玛),Triton X-100(T8787,西格玛)和4',6-二氨基-2-苯基吲哚(D1306;赛默飞世尔)。

[0661] 原代人肝细胞培养

[0662] 原代人肝细胞(5200,ScienCell)在添加2%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的肝细胞培养基(520,ScienCell)中,于37℃和5%CO_2下维持。如正文和/或图例所述,除非在方法中另有规定,否则在用不同剂量的各种重组蛋白刺激24小时前,肝细胞(P2-P3)血清饥饿过夜。

[0663] THP-1培养

[0664] THP-1(ATCC)在添加10％的FBS和0.05mMβ-巯基乙醇的RPMI1640(A1049101,赛默飞世尔)中培养。10ng/ml的PMA在RPMI1640中诱导THP-1细胞分化48小时。

[0665] 流式细胞术

[0666] 对于表面IL11RA、IL6R和gp130分析,用IL11RA、IL6R或gp130抗体和相应的Alexa Fluor488二抗对原代人肝细胞和THP-1细胞进行染色。细胞死亡分析采用死细胞凋亡试剂盒,用Annexin V FITC和PI(V13242,赛默飞世尔)对原代人肝细胞进行染色。用流式细胞仪(Fortessa,BD生物科学)对PI+ve细胞进行定量,并用FlowJo X版软件(TreeStar)进行分析。

[0667] 免疫荧光

[0668] 原代人肝细胞在染色前24小时接种于8孔室玻片(1.5×104细胞/孔)。细胞在4％PFA中固定20分钟,用PBS洗涤,非特异性位点用含5％BSA的PBS封闭2小时。细胞与IL11RA、IL6R、gp130或白蛋白抗体孵育过夜(4℃),然后与适当的Alexa Fluor488第二抗体孵育1小时。在黑暗中干燥载玻片小室,并在载玻片上加入5滴带有DAPI的封固剂15分钟,然后用荧光显微镜(Leica)成像。

[0669] RNA测序(RNA-seq)和核糖体图谱分析(Ribo-seq)

[0670] RNA-seq和Ribo-Seq文库制备如前所述(Chothani等人,2019)。

[0671] RNA-seq文库的生成

[0672] 用RNeasy柱(凯杰公司)从人肝细胞中提取总RNA。用Qubit RNA高灵敏度检测试剂盒(生命技术公司)对RNA进行定量,用LabChip GX RNA检测试剂盒(Perkin Elmer)根据其RNA完整性数评价其质量。TruSeq链mRNA文库制备试剂盒(Illumina)用于按照制造商的标准说明测量转录本丰度。

[0673] Ribo-seq文库的生成

[0674] 肝细胞在10cm培养皿中生长至90％汇合度,并在添加0.1mg/mL放线菌亚胺的1毫升冷裂解缓冲液(如Truseq®Ribo Profile哺乳动物试剂盒,RPHMR12126,Illumina中的配方)中裂解。然后根据制造商的说明,匀浆和澄清的裂解物用Truseq核酸酶(Illumina)进行印迹。核糖体用EXPLUATA Sephacryl S400柱(GE保健公司)纯化,用标准苯酚:氯仿:异戊醇技术提取受保护的RNA片段。在核糖体RNA去除后(哺乳动物RiboZero磁性金,Illumina),然后使用Truseq®Ribo Profile哺乳动物试剂盒根据制造商的方法从足迹RNA中制备测序文库。最后的RNA-seq和核糖体图谱文库是用KAPA文库定量试剂盒(KAPA生物系统)在StepOnePlus实时PCR系统(应用生物系统)上根据制造商的方法进行定量的。

[0675] 用LabChip GX DNA高灵敏度试剂盒(Perkin Elmer)测定最终文库的质量和平均片段大小。使用NextSeq500高输出v2试剂盒和配对端75bp测序化学方法,在NextSeq500 benchtop测序仪(Illumina)上汇集和测序具有独特条码的库。

[0676] RNA测序和核糖体图谱的数据处理与分析

[0677] 原始测序数据用bcl2fastq V2.19.0.316解复用,适体用Trimmomatic(Bolger等人,2014)V0.36修剪,保留修剪后超过20nt的读数。使用bowtie(Langmead等人,2009)将Ribo-seq读数与已知的mtRNA、rRNA和tRNA序列(RNACentral(The RNACentral Consortium,2017),发行5.0)比对,只有未比对的读数保留为核糖体保护片段(RPF)。与人类基因组(hg38)的比对是使用STAR(Dobin等人,2012)进行的。使用具有特征计数的唯一映

射读数(Ensembl数据库版本GRCh38 v86)对Ribo-seq的CDS(编码序列)区域和RNA-seq的外显子区域的基因表达进行量化(Liao等人,2014)。TPM的计算和可视化使用箱线图来比较IL11RA(ENSG00000137070)、IL6R(ENSG00000160712)和gp130(ENSG00000134352)的基线表达。使用Ribo-seq和RNA-seq读取IL11RA、IL6R和gp130的读取覆盖率,使用Gviz R包(Hahne和Ivanek,2016)和链特定比对文件进行可视化。

[0678] 比色分析

[0679] 用ALT活性测定试剂盒(ab105134,Abcam)按照制造商的方法测定细胞培养上清液中ALT活性。

[0680] 免疫印迹

[0681] 对肝细胞总蛋白提取物进行蛋白质印迹。肝细胞裂解液在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(罗氏)的RIPA裂解和提取缓冲液(89901,赛默科技)中匀浆。蛋白质裂解产物经SDS-PAGE分离后转移到PVDF膜上。用ECL检测系统(Pierce)和合适的第二抗体:抗兔HRP或抗鼠HRP显示蛋白条带。

[0682] 统计分析

[0683] 所有统计分析均用GraphPad Prism软件(6.07版)进行。当在一个实验中相互比较几个条件时,根据Tukey对多次检测的P值进行校正。统计显著性的标准是$P<0.05$。

[0684] 7.4实施例7的参考文献

[0685] Agthe,M.,Garbers,Y.,Putoczki,T.和Garbers,C.(2017),白细胞介素11经典而非反式信号传导对于小鼠的生育能力至关重要,Placenta 57,13-16。

[0686] Balic,J.J.,Garbers,C.,Rose-John,S.,Yu,L.和Jenkins,B.J.(2017),白细胞介素11驱动的胃肿瘤发生独立于反式信号传导,细胞因子92,118-123。

[0687] Bolger,A.M.,Lohse,M.和Usadel,B.(2014),Trimmomatic:一个灵活的Illumina序列数据修剪器,生物信息学30,2114-2120。

[0688] Chothani,S.,Schäfer,S.,Adami,E.,Viswanathan,S.,Widjaja,A.A.,Langley,S.R.,Tan,J.,Wang,M.,Quaife,N.M.,Jian Pua,C.等人,(2019),RNA结合蛋白对人心脏纤维化的广泛转化控制,Circulation 140,937-951。

[0689] Dobin,A.,Davis,C.A.,Schlesinger,F.,Drenkow,J.,Zaleski,C.,Jha,S.,Batut,P.,Chaisson,M.和Gingeras,T.R.(2012),STAR:超快通用核糖核酸序列比对器,生物信息学29,15-21。

[0690] Hahne,F.,和Ivanek,R.(2016),利用Gviz和生物导体可视化基因组数据,In Statistical Genomics,(Humana出版社,纽约,纽约州),第335-351页。

[0691] Klein,C.,Wüstefeld,T.,Assmus,U.,Roskams,T.,Rose-John,S.,Müller,M.,Manns,M.P.,Ernst,M.和Trautwein,C.(2005),肝细胞中的IL-6-gp130-STAT3通路在T细胞介导的肝损伤中触发肝脏保护,J.Clin.Invest.115,860-869。

[0692] Kroy,D.C.,Beraza,N.,Tschaharganeh,D.F.,Sander,L.E.,Erschfeld,S.,Giebeler,A.,Liedtke,C.,Wasmuth,H.E.,Trautwein,C.和Streetz,K.L.(2010),肝细胞缺乏白细胞介素6/糖蛋白130/信号转导和转录激活因子3信号传导易导致肝脂肪变性和肝损伤,Hepatology 51,463-473。

[0693] Langmead,B,Trapnell,C,Pop,M,Salzberg,S.L.(2009),短DNA序列与人类基因组

的超快和高效记忆比对,Genome Biol.10,R25。

[0694] Liao,Y.,Smyth,G.K.,and Shi,W.(2014).,featurecounts:一个用于将序列读数分配给基因组特征高效的通用程序,生物信息学30,923-930。

[0695] Matthews,V.B.,Allen,T.L.,Risis,S.,Chan,M.H.S.,Henstridge,D.C.,Watson,N.,Zaffino,L.A.,Babb,J.R.,Boon,J.,Meikle,P.J.等人,(2010),白细胞介素-6缺乏的小鼠出现肝脏炎症和全身胰岛素抵抗,Diabetologia 53,2431-2441。

[0696] Schafer,S.,Viswanathan,S.,Widjaja,A.A.,Lim,W.-W.,Moreno-Moral,A.,Delaut her,D.M.,Ng,B.,Patone,G.,Chow,K.,Khin,E.等人,(2017),IL-11是心血管纤维化的重要决定因素,Nature 552,110-115。

[0697] Schmidt-Arras,D.,和Rose-John,S.(2016),肝脏中IL-6通路的研究:从生理病理到治疗,J.Hepatol.64:1403-1415。

[0698] The RNAcentral Consortium(2017),RNAcentral:非编码RNA序列的综合数据库,Nucleic Acids Res.45,D128-D134。

[0699] Wuestefeld,T.,Klein,C.,Streetz,K.L.,Betz,U.,Lauber,J.,Buer,J.,Manns,M.P.,Müller,W.和Trautwein,C.(2003),白细胞介素6/糖蛋白130依赖的通路在肝再生过程中具有保护作用,J.Biol.Chem.278:11281-11288。

[0001] 序列表

[0002] <110> 新加坡保健服务私人有限公司

[0003] 新加坡国立大学

[0004] R•克莱格 I (仅针对莱索托)

[0005] <120> 肝毒性的治疗

[0006] <130> 007608896

[0007] <150> GB 1900811.9

[0008] <151> 2019-01-21

[0009] <150> GB 1907839.3

[0010] <151> 2019-06-03

[0011] <150> GB 1915003.6

[0012] <151> 2019-10-17

[0013] <160> 29

[0014] <170> PatentIn version 3.5

[0015] <210> 1

[0016] <211> 199

[0017] <212> PRT

[0018] <213> 智人(Homo sapiens)IL-11 11 (UniProt P20809)

[0019] <400> 1

[0020] Met Asn Cys Val Cys Arg Leu Val Leu Val Val Leu Ser Leu Trp Pro

[0021] 1 5 10 15

[0022] Asp Thr Ala Val Ala Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser

[0023] 20 25 30

[0024] Pro Asp Pro Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser

[0025] 35 40 45

[0026] Leu Leu Ala Asp Thr Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe

[0027] 50 55 60

[0028] Pro Ala Asp Gly Asp His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met

[0029] 65 70 75 80

[0030] Ser Ala Gly Ala Leu Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg

[0031] 85 90 95

[0032] Leu Arg Ala Asp Leu Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg

[0033] 100 105 110

[0034] Arg Ala Gly Gly Ser Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr

[0035] 115 120 125

[0036] Leu Gln Ala Arg Leu Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met

[0037] 130 135 140

[0038] Ser Arg Leu Ala Leu Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro

[0039] 145 150 155 160

[0040] Leu Ala Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala

[0041] 165 170 175

[0042] Ile Leu Gly Gly Leu His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu

[0043] 180 185 190

[0044] Leu Leu Leu Lys Thr Arg Leu

[0045] 195

[0046] <210> 2

[0047] <211> 918

[0048] <212> PRT

[0049] <213> 智人(Homo sapiens)gp130 (UniProt P40189-1)

[0050] <400> 2

[0051] Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu

[0052] 1 5 10 15

[0053] Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser

[0054] 20 25 30

[0055] Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys

[0056] 35 40 45

[0057] Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr

[0058] 50 55 60

[0059] Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr

[0060] 65 70 75 80

[0061] Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser

[0062] 85 90 95

[0063] Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu

[0064] 100 105 110

[0065] Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys

[0066] 115 120 125

[0067] Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys

[0068] 130 135 140

[0069] Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu

[0070] 145 150 155 160

[0071] Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg

[0072] 165 170 175

[0073] Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val

[0074] 180 185 190

[0075] Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr

[0076] 195 200 205

[0077] Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro

[0078] 210 215 220

[0079] Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu

[0080] 225 230 235 240

[0081] Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys

[0082] 245 250 255

[0083] Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile

[0084] 260 265 270

[0085] Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp

[0086] 275 280 285

[0087] Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu

[0088] 290 295 300

[0089] Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile

[0090] 305 310 315 320

[0091] Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile

[0092] 325 330 335

[0093] Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys

[0094] 340 345 350

[0095] Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val

[0096] 355 360 365

[0097] Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala

[0098] 370 375 380

[0099] Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu

[0100] 385 390 395 400

[0101] Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile

[0102] 405 410 415

[0103] Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala

[0104] 420 425 430

[0105] Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu

[0106] 435 440 445

[0107] Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala

[0108] 450 455 460

[0109] Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr

[0110] 465 470 475 480

[0111] Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val

[0112] 485 490 495

[0113] Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala

[0114] 500 505 510

[0115] Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys

[0116] 515 520 525

[0117] Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val
[0118] 530 535 540
[0119] Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr
[0120] 545 550 555 560
[0121] Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu
[0122] 565 570 575
[0123] Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
[0124] 580 585 590
[0125] Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
[0126] 595 600 605
[0127] Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
[0128] 610 615 620
[0129] Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
[0130] 625 630 635 640
[0131] Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
[0132] 645 650 655
[0133] Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
[0134] 660 665 670
[0135] Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
[0136] 675 680 685
[0137] Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
[0138] 690 695 700
[0139] Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
[0140] 705 710 715 720
[0141] Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
[0142] 725 730 735
[0143] Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
[0144] 740 745 750
[0145] Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
[0146] 755 760 765
[0147] His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
[0148] 770 775 780
[0149] Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
[0150] 785 790 795 800
[0151] His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
[0152] 805 810 815
[0153] Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
[0154] 820 825 830
[0155] Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu

[0156] 835 840 845

[0157] Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln

[0158] 850 855 860

[0159] Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly

[0160] 865 870 875 880

[0161] Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala

[0162] 885 890 895

[0163] Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln

[0164] 900 905 910

[0165] Gly Gly Tyr Met Pro Gln

[0166] 915

[0167] <210> 3

[0168] <211> 422

[0169] <212> PRT

[0170] <213> 智人(Homo sapiens)IL11RA (UniProt Q14626)

[0171] <400> 3

[0172] Met Ser Ser Ser Cys Ser Gly Leu Ser Arg Val Leu Val Ala Val Ala

[0173] 1 5 10 15

[0174] Thr Ala Leu Val Ser Ala Ser Ser Pro Cys Pro Gln Ala Trp Gly Pro

[0175] 20 25 30

[0176] Pro Gly Val Gln Tyr Gly Gln Pro Gly Arg Ser Val Lys Leu Cys Cys

[0177] 35 40 45

[0178] Pro Gly Val Thr Ala Gly Asp Pro Val Ser Trp Phe Arg Asp Gly Glu

[0179] 50 55 60

[0180] Pro Lys Leu Leu Gln Gly Pro Asp Ser Gly Leu Gly His Glu Leu Val

[0181] 65 70 75 80

[0182] Leu Ala Gln Ala Asp Ser Thr Asp Glu Gly Thr Tyr Ile Cys Gln Thr

[0183] 85 90 95

[0184] Leu Asp Gly Ala Leu Gly Gly Thr Val Thr Leu Gln Leu Gly Tyr Pro

[0185] 100 105 110

[0186] Pro Ala Arg Pro Val Val Ser Cys Gln Ala Ala Asp Tyr Glu Asn Phe

[0187] 115 120 125

[0188] Ser Cys Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ile Ser Gly Leu Pro Thr Arg Tyr

[0189] 130 135 140

[0190] Leu Thr Ser Tyr Arg Lys Lys Thr Val Leu Gly Ala Asp Ser Gln Arg

[0191] 145 150 155 160

[0192] Arg Ser Pro Ser Thr Gly Pro Trp Pro Cys Pro Gln Asp Pro Leu Gly

[0193] 165 170 175

[0194] Ala Ala Arg Cys Val Val His Gly Ala Glu Phe Trp Ser Gln Tyr Arg

[0195] 180 185 190

[0196] Ile Asn Val Thr Glu Val Asn Pro Leu Gly Ala Ser Thr Arg Leu Leu

[0197] 195 200 205

[0198] Asp Val Ser Leu Gln Ser Ile Leu Arg Pro Asp Pro Pro Gln Gly Leu

[0199] 210 215 220

[0200] Arg Val Glu Ser Val Pro Gly Tyr Pro Arg Arg Leu Arg Ala Ser Trp

[0201] 225 230 235 240

[0202] Thr Tyr Pro Ala Ser Trp Pro Cys Gln Pro His Phe Leu Leu Lys Phe

[0203] 245 250 255

[0204] Arg Leu Gln Tyr Arg Pro Ala Gln His Pro Ala Trp Ser Thr Val Glu

[0205] 260 265 270

[0206] Pro Ala Gly Leu Glu Glu Val Ile Thr Asp Ala Val Ala Gly Leu Pro

[0207] 275 280 285

[0208] His Ala Val Arg Val Ser Ala Arg Asp Phe Leu Asp Ala Gly Thr Trp

[0209] 290 295 300

[0210] Ser Thr Trp Ser Pro Glu Ala Trp Gly Thr Pro Ser Thr Gly Thr Ile

[0211] 305 310 315 320

[0212] Pro Lys Glu Ile Pro Ala Trp Gly Gln Leu His Thr Gln Pro Glu Val

[0213] 325 330 335

[0214] Glu Pro Gln Val Asp Ser Pro Ala Pro Pro Arg Pro Ser Leu Gln Pro

[0215] 340 345 350

[0216] His Pro Arg Leu Leu Asp His Arg Asp Ser Val Glu Gln Val Ala Val

[0217] 355 360 365

[0218] Leu Ala Ser Leu Gly Ile Leu Ser Phe Leu Gly Leu Val Ala Gly Ala

[0219] 370 375 380

[0220] Leu Ala Leu Gly Leu Trp Leu Arg Leu Arg Arg Gly Gly Lys Asp Gly

[0221] 385 390 395 400

[0222] Ser Pro Lys Pro Gly Phe Leu Ala Ser Val Ile Pro Val Asp Arg Arg

[0223] 405 410 415

[0224] Pro Gly Ala Pro Asn Leu

[0225] 420

[0226] <210> 4

[0227] <211> 19

[0228] <212> DNA

[0229] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0230] <220>

[0231] <223> siRNA靶向IL-11

[0232] <400> 4

[0233] ccttccaaag ccagatctt 19

[0234] <210> 5

[0235] <211> 19

[0236] <212> DNA

[0237] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0238] <220>

[0239] <223> siRNA靶向IL-11

[0240] <400> 5

[0241] gcctgggcag gaacatata 19

[0242] <210> 6

[0243] <211> 19

[0244] <212> DNA

[0245] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0246] <220>

[0247] <223> siRNA靶向IL-11

[0248] <400> 6

[0249] cctgggcagg aacatatat 19

[0250] <210> 7

[0251] <211> 19

[0252] <212> DNA

[0253] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0254] <220>

[0255] <223> siRNA靶向IL-11

[0256] <400> 7

[0257] ggttcattat ggctgtgtt 19

[0258] <210> 8

[0259] <211> 19

[0260] <212> DNA

[0261] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0262] <220>

[0263] <223> siRNA靶向IL-11Rα

[0264] <400> 8

[0265] ggaccatacc aaaggagat 19

[0266] <210> 9

[0267] <211> 19

[0268] <212> DNA

[0269] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0270] <220>

[0271] <223> siRNA靶向IL-11Rα

[0272] <400> 9

[0273] gcgtctttgg gaatccttt 19

[0274] <210> 10

[0275] <211> 18

[0276] <212> DNA

[0277] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0278] <220>

[0279] <223> siRNA靶向IL-11Rα

[0280] <400> 10

[0281] gcaggacagt agatccct 18

[0282] <210> 11

[0283] <211> 19

[0284] <212> DNA

[0285] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0286] <220>

[0287] <223> siRNA靶向IL-11Rα

[0288] <400> 11

[0289] gctcaaggaa cgtgtgtaa 19

[0290] <210> 12

[0291] <211> 42

[0292] <212> DNA

[0293] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0294] <220>

[0295] <223> IL-11 (NM_000641.3)的siRNA

[0296] <220>

[0297] <221> misc_feature

[0298] <222> (20)..(21)

[0299] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0300] <220>

[0301] <221> misc_feature

[0302] <222> (41)..(42)

[0303] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0304] <400> 12

[0305] ccuuccaaag ccagaucuun naagaucugg cuuuggaagg nn 42

[0306] <210> 13

[0307] <211> 42

[0308] <212> DNA

[0309] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0310] <220>

[0311] <223> IL-11 (NM_000641.3)的siRNA

[0312] <220>

[0313] <221> misc_feature

[0314] <222> (20)..(21)

[0315] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0316] <220>

[0317] <221> misc_feature

[0318] <222> (41)..(42)

[0319] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0320] <400> 13

[0321] gccugggcag gaacauauan nuauauguuc cugcccaggc nn 42

[0322] <210> 14

[0323] <211> 42

[0324] <212> DNA

[0325] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0326] <220>

[0327] <223> IL-11 (NM_000641.3)的siRNA

[0328] <220>

[0329] <221> misc_feature

[0330] <222> (20)..(21)

[0331] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0332] <220>

[0333] <221> misc_feature

[0334] <222> (41)..(42)

[0335] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0336] <400> 14

[0337] ccugggcagg aacauauaun nauauauguu ccugcccagg nn 42

[0338] <210> 15

[0339] <211> 42

[0340] <212> DNA

[0341] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0342] <220>

[0343] <223> IL-11 (NM_000641.3)的siRNA

[0344] <220>

[0345] <221> misc_feature

[0346] <222> (20)..(21)

[0347] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0348] <220>

[0349] <221> misc_feature

[0350] <222> (41)..(42)

[0351] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0352] <400> 15

[0353] gguucauuau ggcuguguun naacacagcc auaaugaacc nn 42

[0354] <210> 16

[0355] <211> 42

[0356] <212> DNA

[0357] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0358] <220>

[0359] <223> IL-11Rα (U32324.1)的siRNA

[0360] <220>

[0361] <221> misc_feature

[0362] <222> (20)..(21)

[0363] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0364] <220>

[0365] <221> misc_feature

[0366] <222> (41)..(42)

[0367] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0368] <400> 16

[0369] ggaccauacc aaaggagaun naucuccuuu gguauggucc nn 42

[0370] <210> 17

[0371] <211> 42

[0372] <212> DNA

[0373] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0374] <220>

[0375] <223> IL-11Rα (U32324.1)的siRNA

[0376] <220>

[0377] <221> misc_feature

[0378] <222> (20)..(21)

[0379] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0380] <220>

[0381] <221> misc_feature

[0382] <222> (41)..(42)

[0383] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0384] <400> 17

[0385] gcgucuuugg gaauccuuun naaaggauuc ccaaagacgc nn 42

[0386] <210> 18

[0387] <211> 42

[0388] <212> DNA

[0389] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0390] <220>

[0391] <223> IL-11Rα (U32324.1)的siRNA

[0392] <220>

[0393] <221> misc_feature

[0394] <222> (20)..(21)

[0395] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0396] <220>

[0397] <221> misc_feature

[0398] <222> (41)..(42)

[0399] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0400] <400> 18

[0401] gcaggacagu agaucccuan nuagggaucu acuguccugc nn 42

[0402] <210> 19

[0403] <211> 42

[0404] <212> DNA

[0405] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0406] <220>

[0407] <223> IL-11Rα (U32324.1)的siRNA

[0408] <220>

[0409] <221> misc_feature

[0410] <222> (20)..(21)

[0411] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0412] <220>

[0413] <221> misc_feature

[0414] <222> (41)..(42)

[0415] <223> n = 脱氧胸腺嘧啶

[0416] <400> 19

[0417] gcucaaggaa cguguguaan nuuacacacg uuccuugagc nn 42

[0418] <210> 20

[0419] <211> 21

[0420] <212> PRT

[0421] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0422] <220>

[0423] <223> 20氨基酸接头

[0424] <400> 20

[0425] Gly Pro Ala Gly Gln Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

[0426] 1 5 10 15

[0427] Gly Gly Gly Ser Val

[0428] 20

[0429] <210> 21

[0430] <211> 516

[0431] <212> PRT

[0432] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0433] <220>

[0434] <223> Hyper IL-11 (IL-11RA:IL-11融合)

[0435] <400> 21

[0436] Met Ser Ser Ser Cys Ser Gly Leu Ser Arg Val Leu Val Ala Val Ala

[0437] 1 5 10 15

[0438] Thr Ala Leu Val Ser Ala Ser Ser Pro Cys Pro Gln Ala Trp Gly Pro

[0439] 20 25 30

[0440] Pro Gly Val Gln Tyr Gly Gln Pro Gly Arg Ser Val Lys Leu Cys Cys

[0441] 35 40 45

[0442] Pro Gly Val Thr Ala Gly Asp Pro Val Ser Trp Phe Arg Asp Gly Glu

[0443] 50 55 60

[0444] Pro Lys Leu Leu Gln Gly Pro Asp Ser Gly Leu Gly His Glu Leu Val

[0445] 65 70 75 80

[0446] Leu Ala Gln Ala Asp Ser Thr Asp Glu Gly Thr Tyr Ile Cys Gln Thr

[0447] 85 90 95

[0448] Leu Asp Gly Ala Leu Gly Gly Thr Val Thr Leu Gln Leu Gly Tyr Pro

[0449] 100 105 110

[0450] Pro Ala Arg Pro Val Val Ser Cys Gln Ala Ala Asp Tyr Glu Asn Phe

[0451] 115 120 125

[0452] Ser Cys Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ile Ser Gly Leu Pro Thr Arg Tyr

[0453] 130 135 140

[0454] Leu Thr Ser Tyr Arg Lys Lys Thr Val Leu Gly Ala Asp Ser Gln Arg

[0455] 145 150 155 160

[0456] Arg Ser Pro Ser Thr Gly Pro Trp Pro Cys Pro Gln Asp Pro Leu Gly

[0457] 165 170 175

[0458] Ala Ala Arg Cys Val Val His Gly Ala Glu Phe Trp Ser Gln Tyr Arg

[0459] 180 185 190

[0460] Ile Asn Val Thr Glu Val Asn Pro Leu Gly Ala Ser Thr Arg Leu Leu

[0461] 195 200 205

[0462] Asp Val Ser Leu Gln Ser Ile Leu Arg Pro Asp Pro Pro Gln Gly Leu

[0463] 210 215 220

[0464] Arg Val Glu Ser Val Pro Gly Tyr Pro Arg Arg Leu Arg Ala Ser Trp

[0465] 225 230 235 240

[0466] Thr Tyr Pro Ala Ser Trp Pro Cys Gln Pro His Phe Leu Leu Lys Phe

[0467] 245 250 255

[0468] Arg Leu Gln Tyr Arg Pro Ala Gln His Pro Ala Trp Ser Thr Val Glu
[0469] 260 265 270
[0470] Pro Ala Gly Leu Glu Glu Val Ile Thr Asp Ala Val Ala Gly Leu Pro
[0471] 275 280 285
[0472] His Ala Val Arg Val Ser Ala Arg Asp Phe Leu Asp Ala Gly Thr Trp
[0473] 290 295 300
[0474] Ser Thr Trp Ser Pro Glu Ala Trp Gly Thr Pro Ser Thr Gly Pro Ala
[0475] 305 310 315 320
[0476] Gly Gln Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0477] 325 330 335
[0478] Ser Val Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro
[0479] 340 345 350
[0480] Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala
[0481] 355 360 365
[0482] Asp Thr Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp
[0483] 370 375 380
[0484] Gly Asp His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met Ser Ala Gly
[0485] 385 390 395 400
[0486] Ala Leu Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Ala
[0487] 405 410 415
[0488] Asp Leu Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly
[0489] 420 425 430
[0490] Gly Ser Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala
[0491] 435 440 445
[0492] Arg Leu Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu
[0493] 450 455 460
[0494] Ala Leu Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro
[0495] 465 470 475 480
[0496] Pro Ser Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly
[0497] 485 490 495
[0498] Gly Leu His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu
[0499] 500 505 510
[0500] Lys Thr Arg Leu
[0501] 515
[0502] <210> 22
[0503] <211> 23
[0504] <212> DNA
[0505] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0506] <220>

[0507] <223> I111 基因分型引物 F

[0508] <400> 22

[0509] ggagggaggg gacgccaatg acc 23

[0510] <210> 23

[0511] <211> 24

[0512] <212> DNA

[0513] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0514] <220>

[0515] <223> 111 基因分型引物 R

[0516] <400> 23

[0517] tctgcctccc ctgcctgttt ctcg 24

[0518] <210> 24

[0519] <211> 18

[0520] <212> DNA

[0521] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0522] <220>

[0523] <223> I111-荧光素酶 基因分型引物 F

[0524] <400> 24

[0525] aattccgtgg tgttgtcg 18

[0526] <210> 25

[0527] <211> 24

[0528] <212> DNA

[0529] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0530] <220>

[0531] <223> I111-荧光素酶 基因分型引物 R

[0532] <400> 25

[0533] tctgcctccc ctgcctgttt ctcg 24

[0534] <210> 26

[0535] <211> 24

[0536] <212> DNA

[0537] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0538] <220>

[0539] <223> I111-EGFP 基因分型引物 F

[0540] <400> 26

[0541] gaaatgagag cctagagtcc agag 24

[0542] <210> 27

[0543] <211> 24

[0544] <212> DNA

[0545] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0546] <220>

[0547] <223> I111-EGFP 基因分型引物 R

[0548] <400> 27

[0549] gaggcttgga agaatgcaca atta 24

[0550] <210> 28

[0551] <211> 5

[0552] <212> PRT

[0553] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0554] <220>

[0555] <223> 保守基序

[0556] <220>

[0557] <221> misc_feature

[0558] <222> (3)..(3)

[0559] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0560] <400> 28

[0561] Trp Ser Xaa Trp Ser

[0562] 1 5

[0563] <210> 29

[0564] <211> 54

[0565] <212> DNA

[0566] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0567] <220>

[0568] <223> 敲入位点

[0569] <400> 29

[0570] aacccctggc ctgtggggac atgaactgta agttggttcc agttcatggg tgag 54

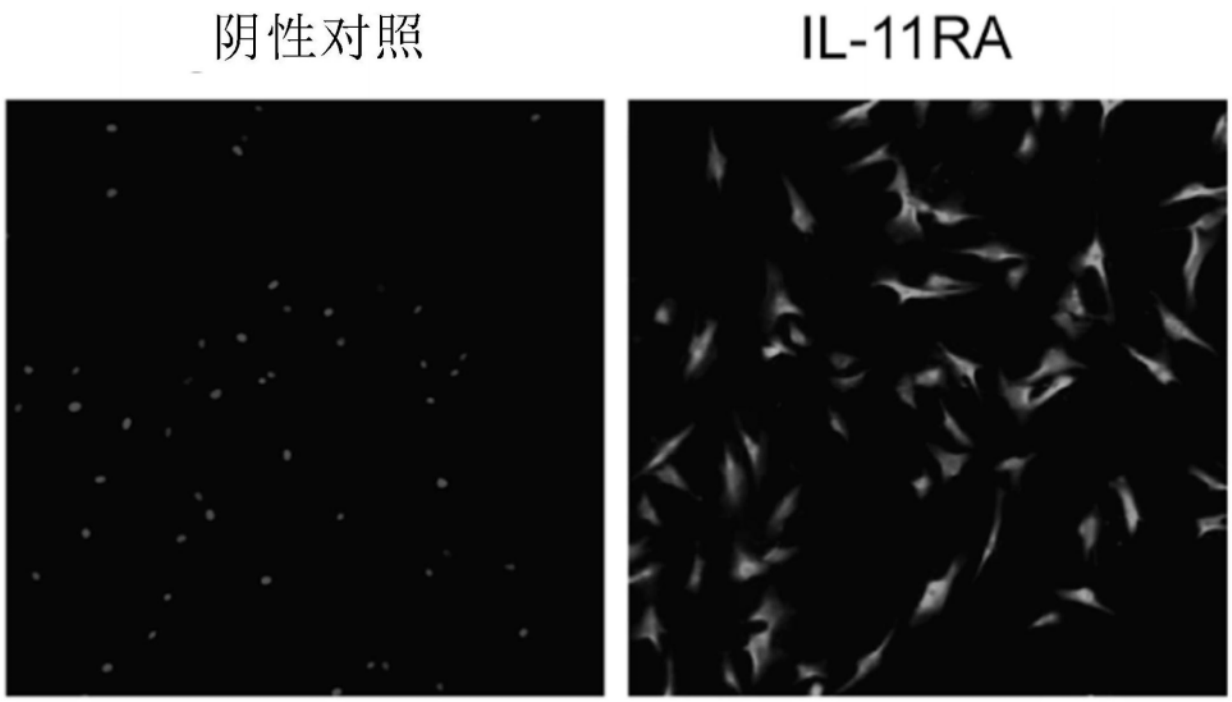

阴性对照
IL-11RA

图1A

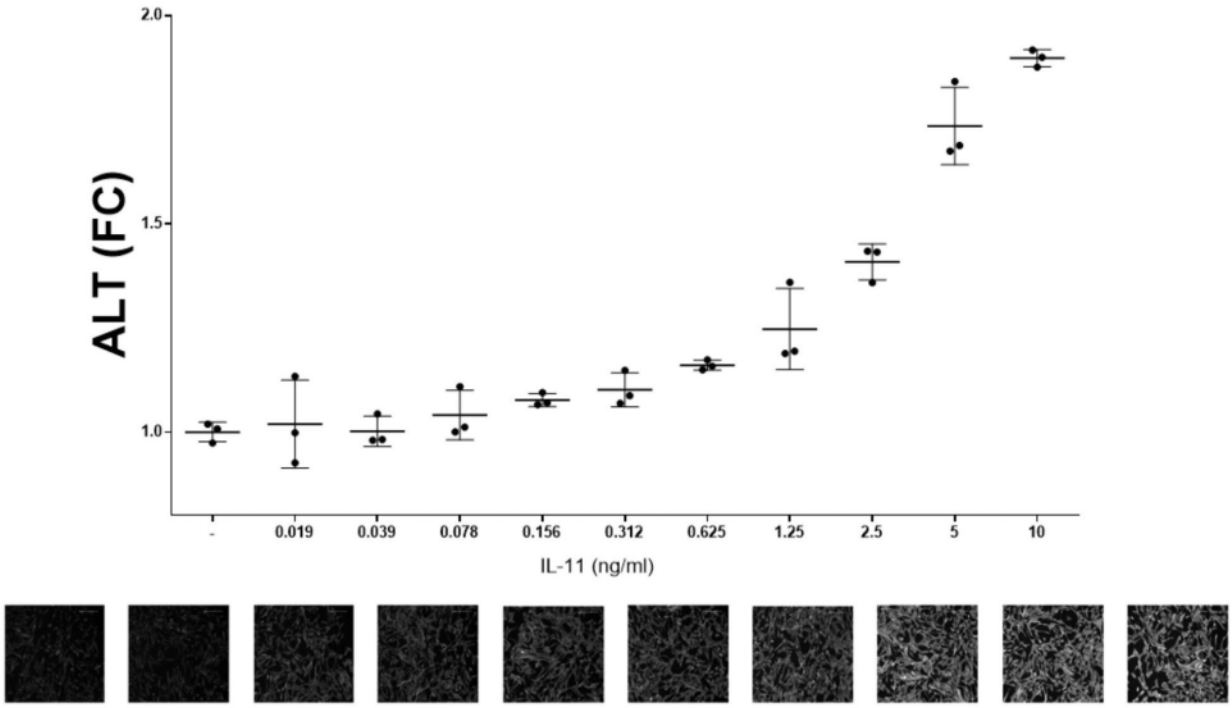

ALT (FC)
2.0
1.5
1.0
-
0.019
0.039
0.078
0.156
0.312
0.625
1.25
2.5
5
10
IL-11 (ng/ml)

图1B

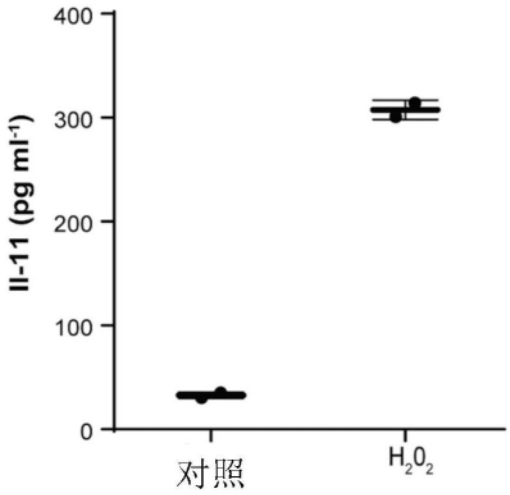

400
300
200
100
0
Il-11 (pg ml-1)
对照
H202

图1C

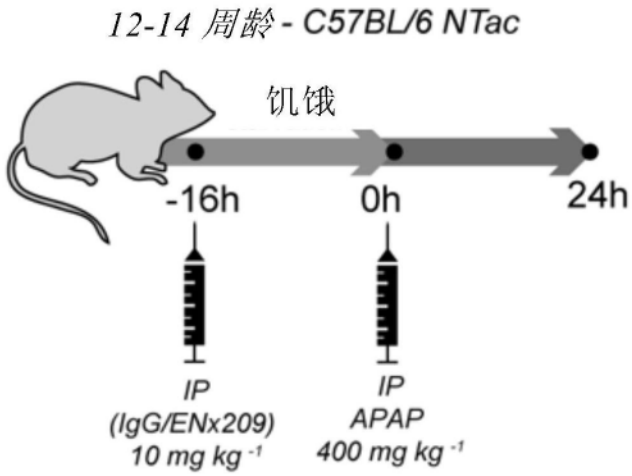

12-14 周龄 - C57BL/6 NTac
饥饿
-16h
0h
24h
IP
(IgG/ENx209)
10 mg kg -1
IP
APAP
400 mg kg -1

图2A

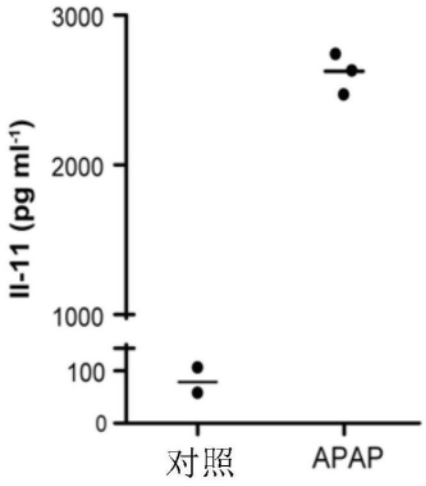

3000
2000
1000
100
0
Il-11 (pg ml-1)
对照
APAP

图2B

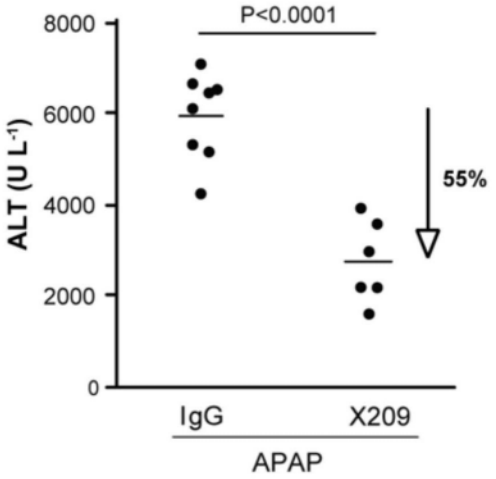

P<0.0001
8000
6000
4000
2000
0
ALT (U L-1)
55%
IgG
X209
APAP

图2C

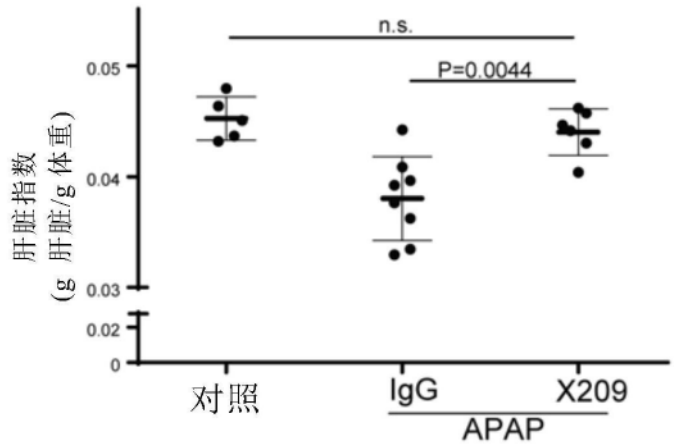

n.s.
P=0.0044
0.05
0.04
0.03
0.02
0
肝脏指数
(g 肝脏/g 体重)
对照
IgG
X209
APAP

图2D

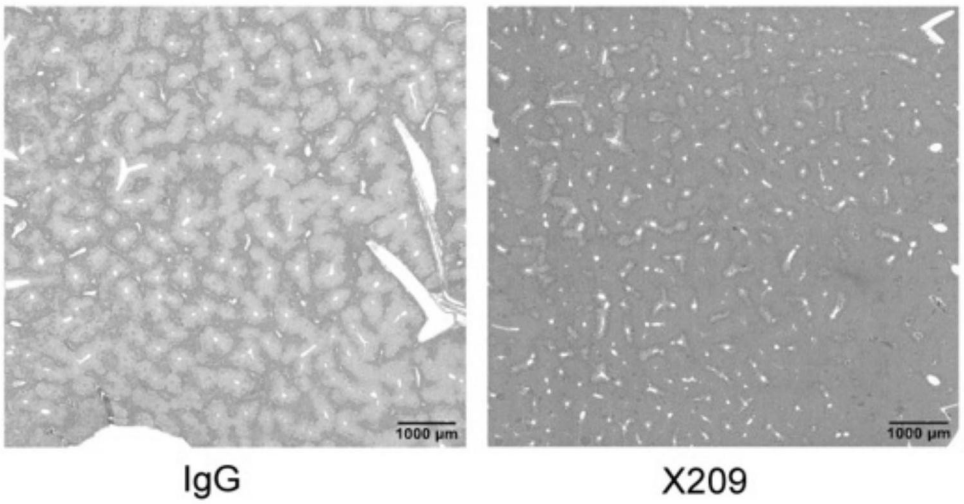

1000 μm
1000 μm
IgG
X209

图2E

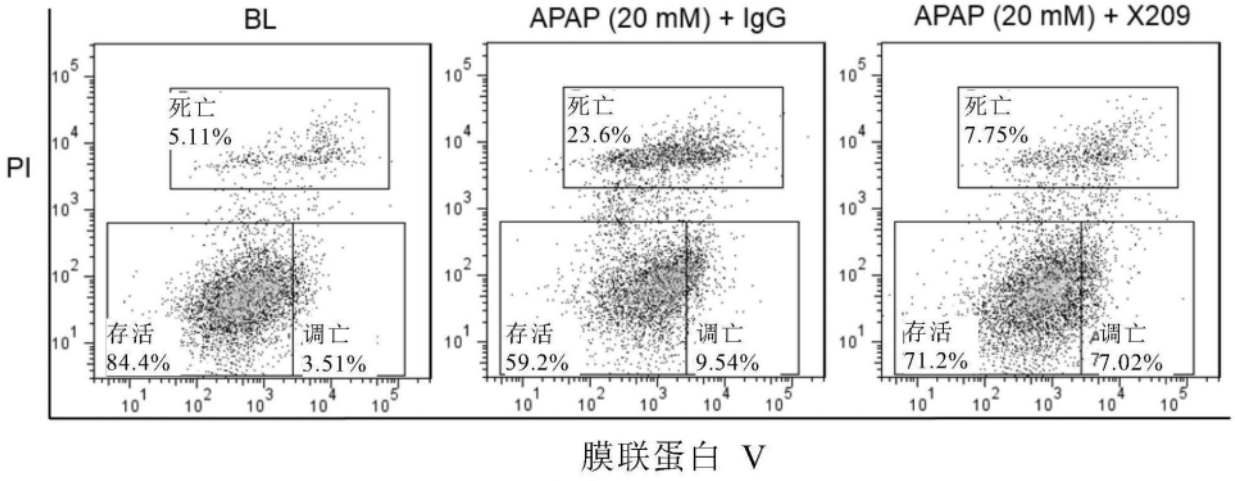

BL
APAP (20 mM) + IgG
APAP (20 mM) + X209
PI
死亡
5.11%
存活
84.4%
调亡
3.51%
死亡
23.6%
存活
59.2%
调亡
9.54%
死亡
7.75%
存活
71.2%
调亡
77.02%
膜联蛋白 V

图3

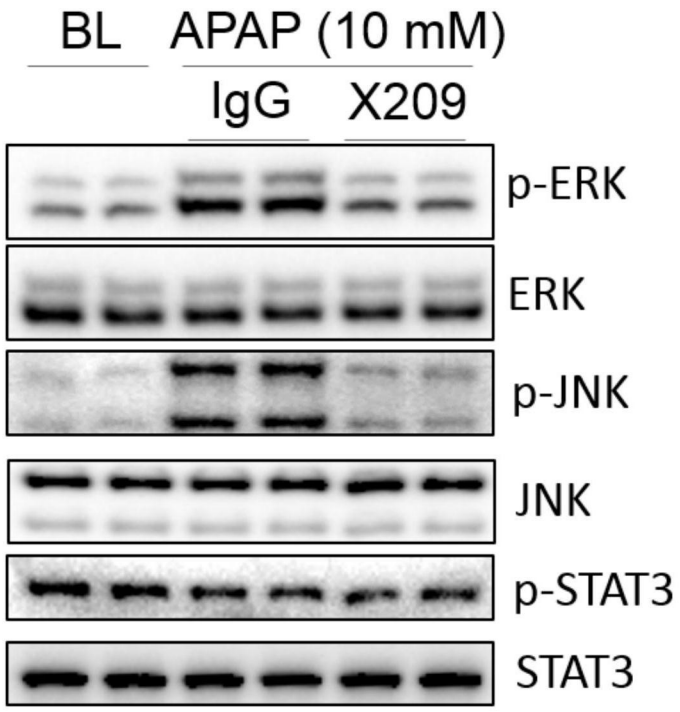

BL
APAP (10 mM)
IgG
X209
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-STAT3
STAT3

图4

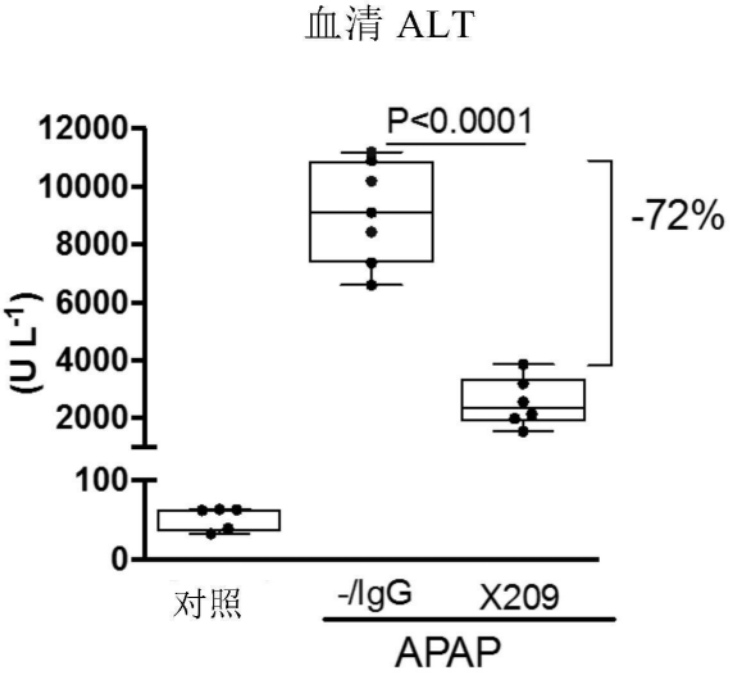

血清 ALT
P<0.0001
-72%
12000
10000
8000
6000
4000
2000
100
0
(U L-1)
对照
-/IgG
X209
APAP

图5A

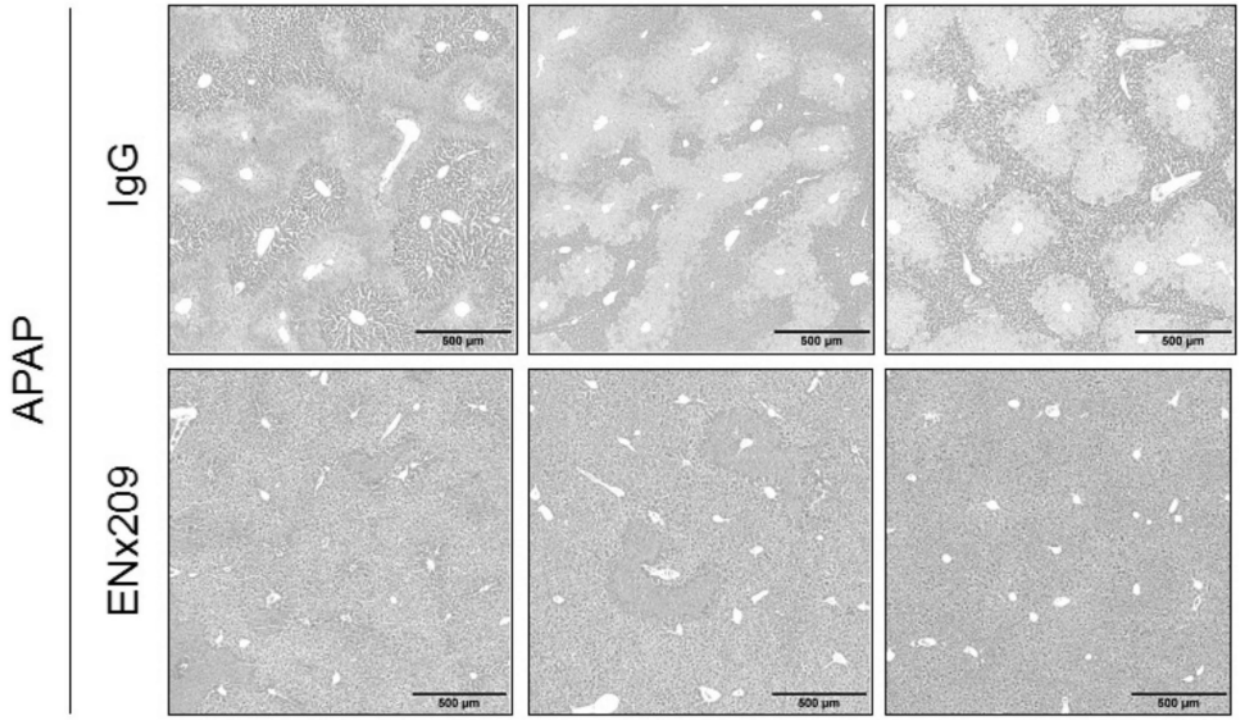

APAP
IgG
ENx209
500 μm

图5B

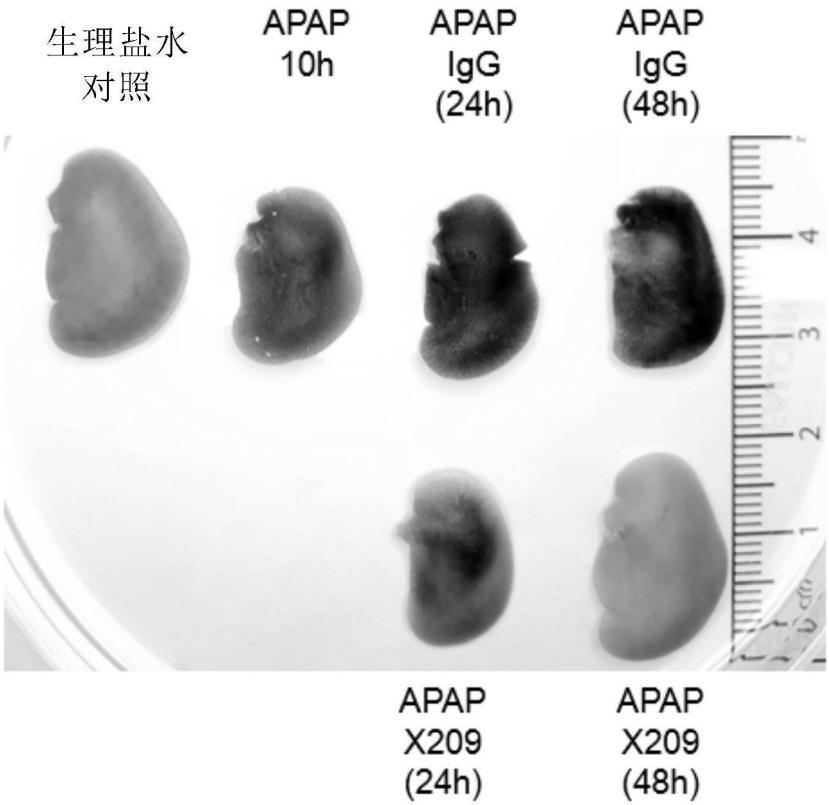

生理盐水
对照
APAP
10h
APAP
IgG
(24h)
APAP
IgG
(48h)
APAP
X209
(24h)
APAP
X209
(48h)

图6A

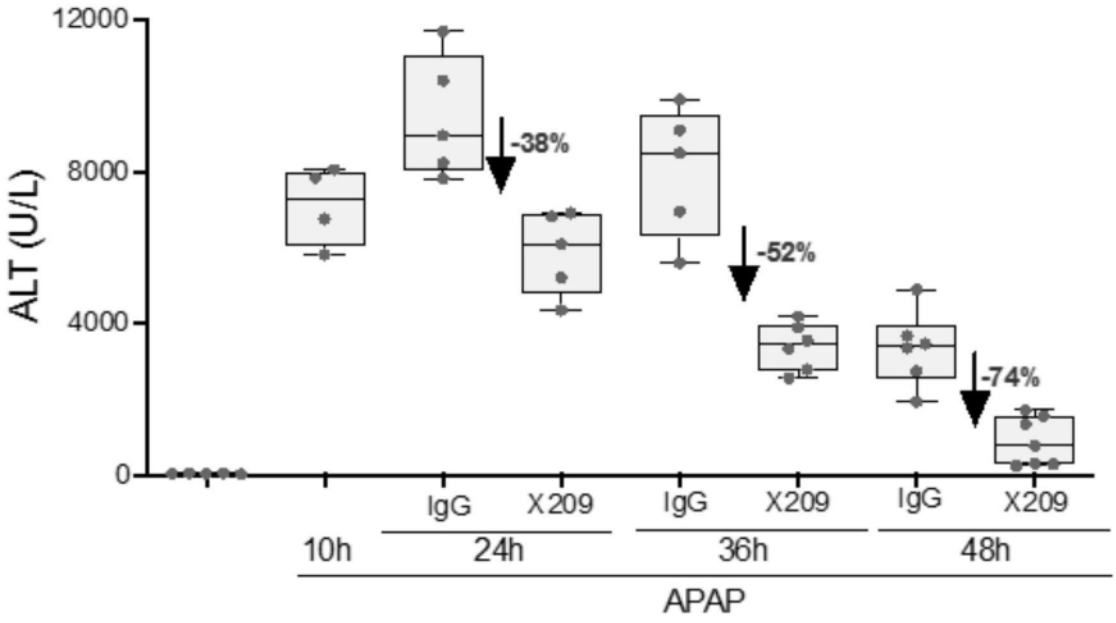

12000
8000
4000
0
ALT (U/L)
-38%
-52%
-74%
IgG
X209
IgG
X209
IgG
X209
10h
24h
36h
48h
APAP

图6B

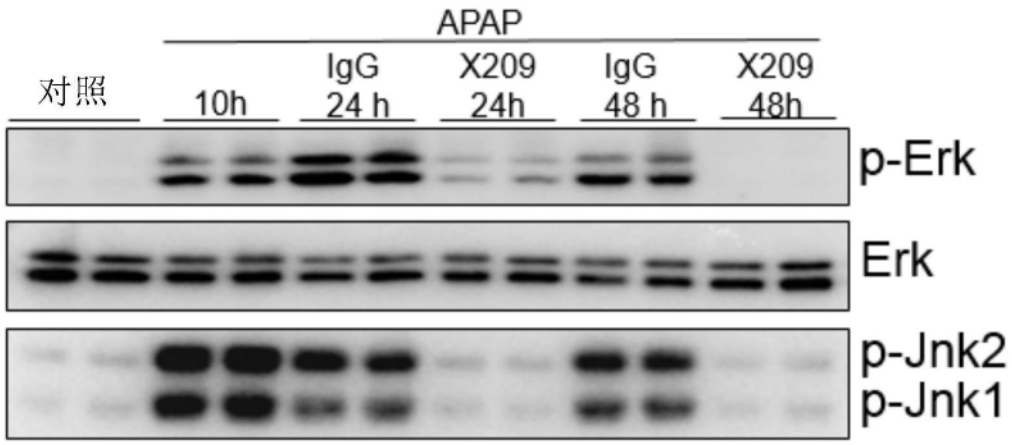

APAP
对照
10h
IgG
24 h
X209
24h
IgG
48 h
X209
48h
p-Erk
Erk
p-Jnk2
p-Jnk1

图7

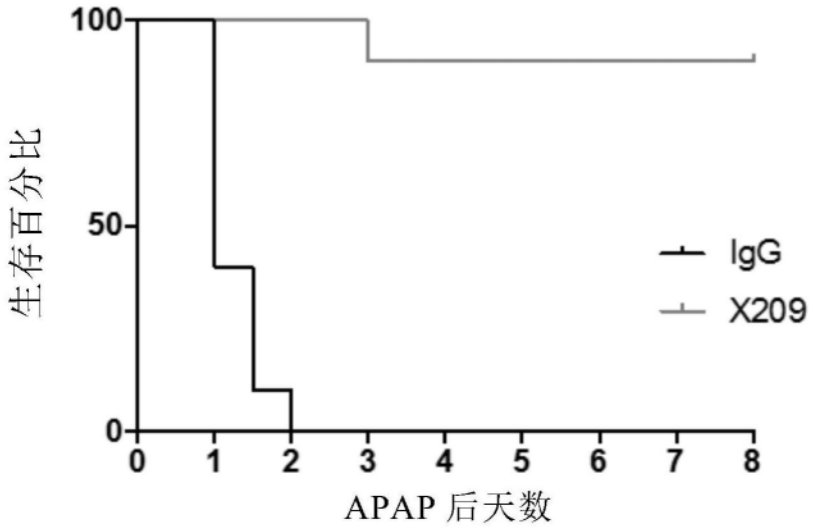

100
50
0
生存百分比
0
1
2
3
4
5
6
7
8
APAP 后天数
IgG
X209

图8A

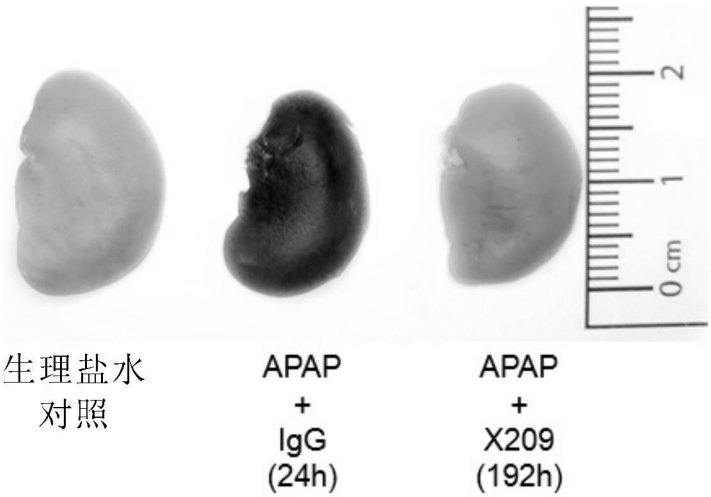

0 cm
1
2
生理盐水
对照
APAP
+
IgG
(24h)
APAP
+
X209
(192h)

图8B

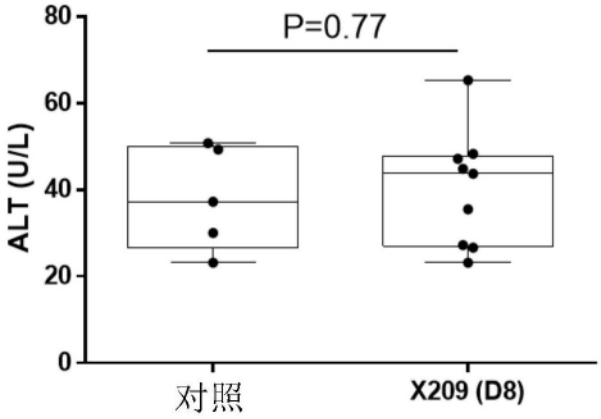

P=0.77
ALT (U/L)
80
60
40
20
0
对照
X209 (D8)

图8C

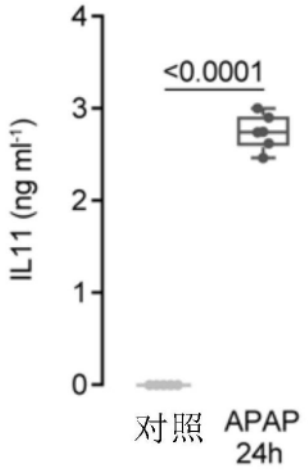

<0.0001
IL11 (ng ml-1)
4
3
2
1
0
对照
APAP 24h

图9A

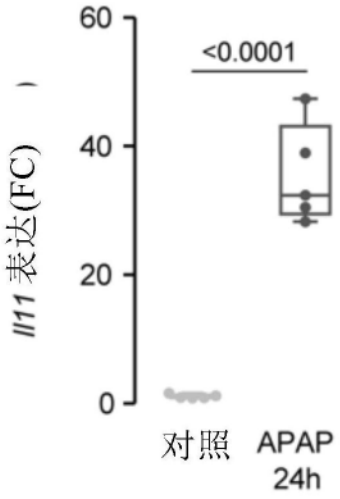

<0.0001
Il11 表达(FC)
60
40
20
0
对照
APAP 24h

图9B

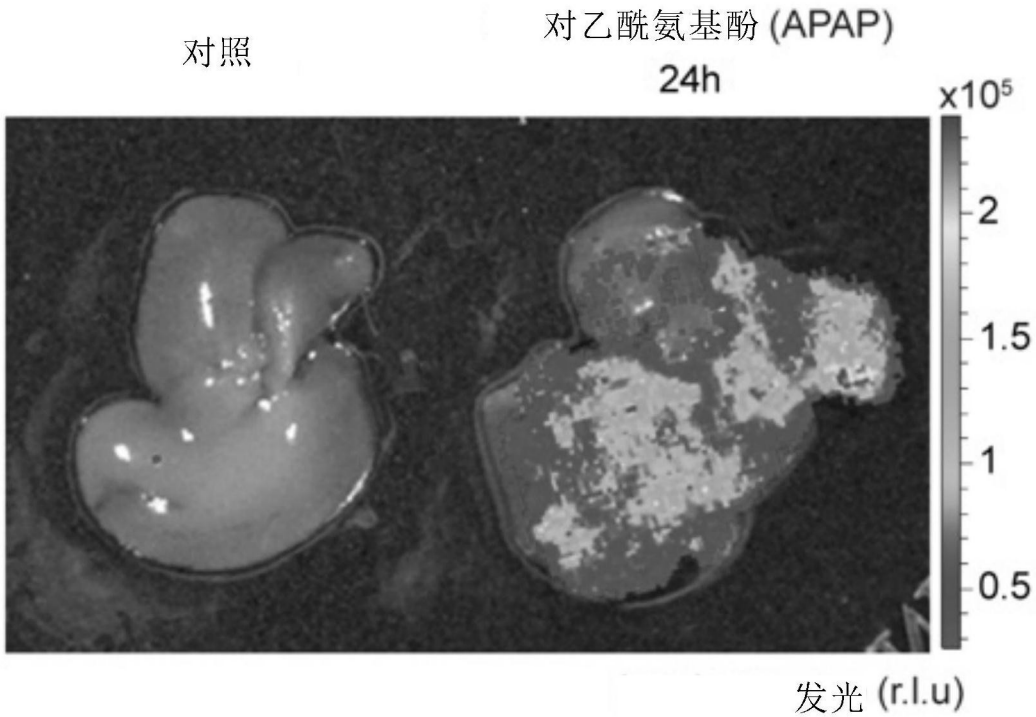

对照
对乙酰氨基酚 (APAP)
24h
x10⁵
2
1.5
1
0.5
发光 (r.l.u)

图9C

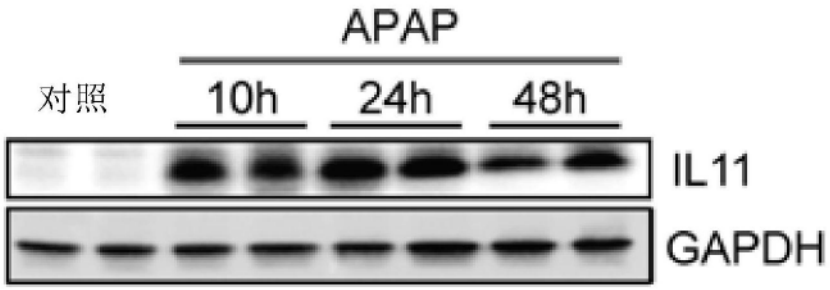

APAP
对照
10h
24h
48h
IL11
GAPDH

图9D

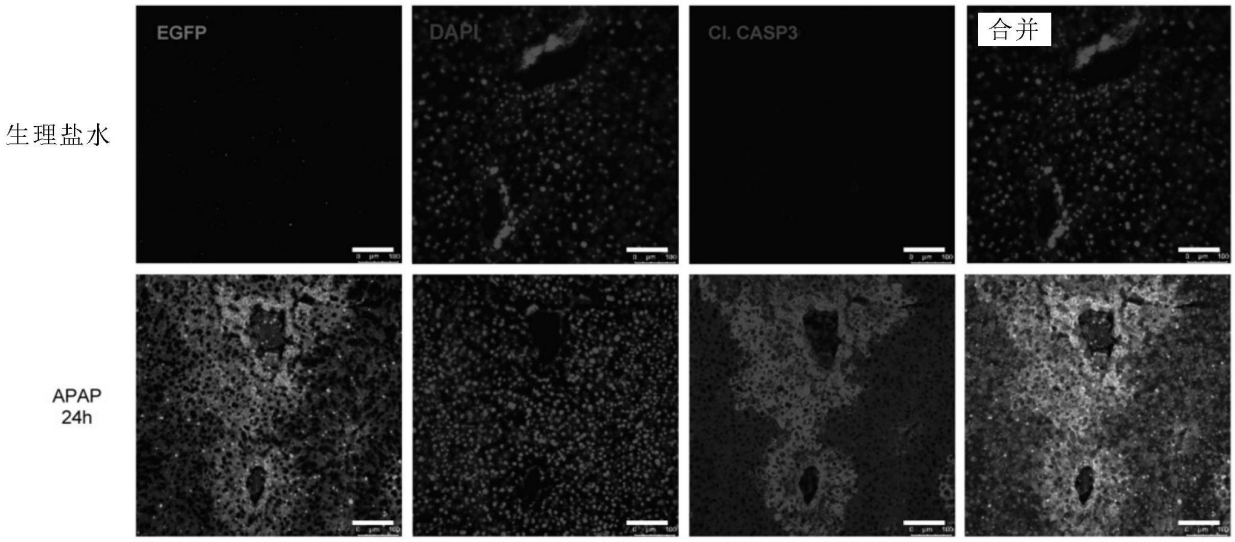

EGFP
DAPI
Cl. CASP3
合并
生理盐水
APAP
24h

图9E

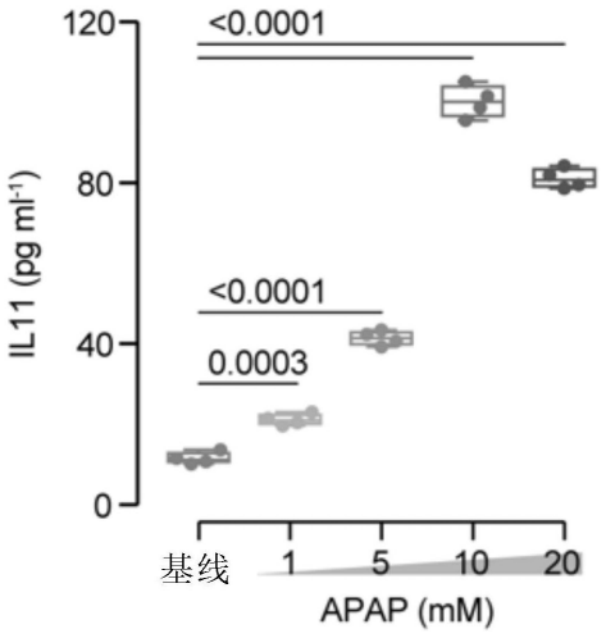

120
80
40
0
IL11 (pg ml-1)
<0.0001
<0.0001
0.0003
基线
1
5
10
20
APAP (mM)

图9F

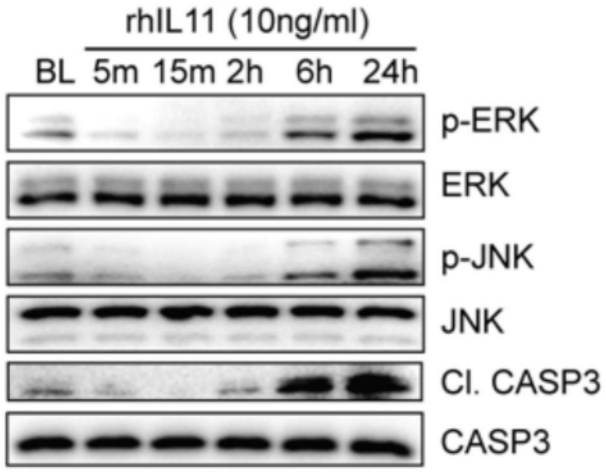

rhIL11 (10ng/ml)
BL 5m 15m 2h 6h 24h
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
Cl. CASP3
CASP3

图9G

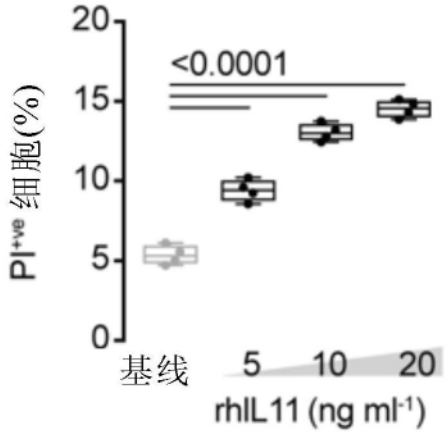

20
15
10
5
0
<0.0001
PI+ve 细胞(%)
基线 5 10 20
rhIL11 (ng ml-1)

图9H

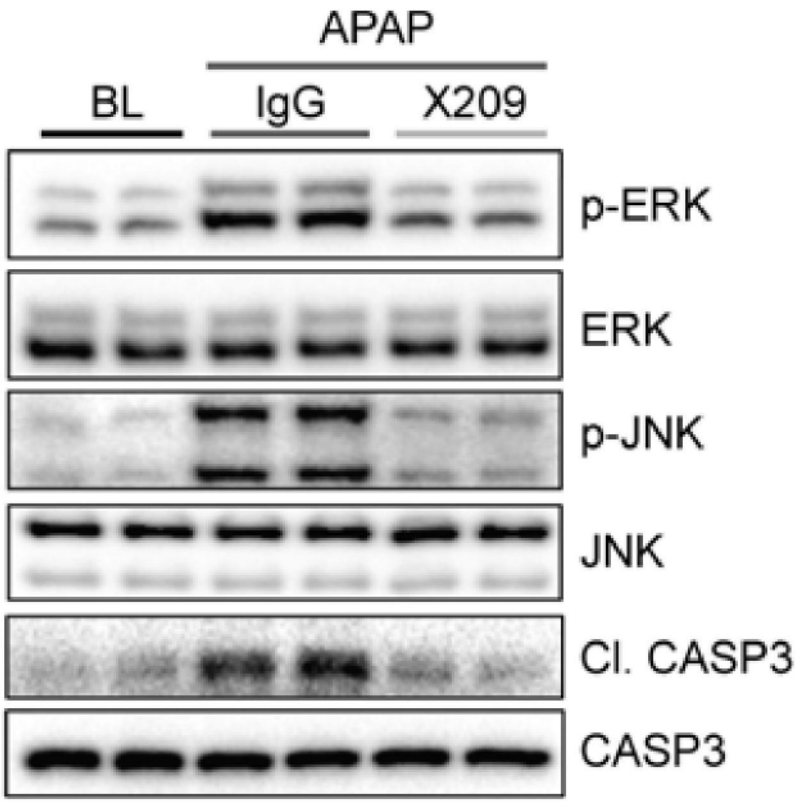

APAP
BL
IgG
X209
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
Cl. CASP3
CASP3

图9I

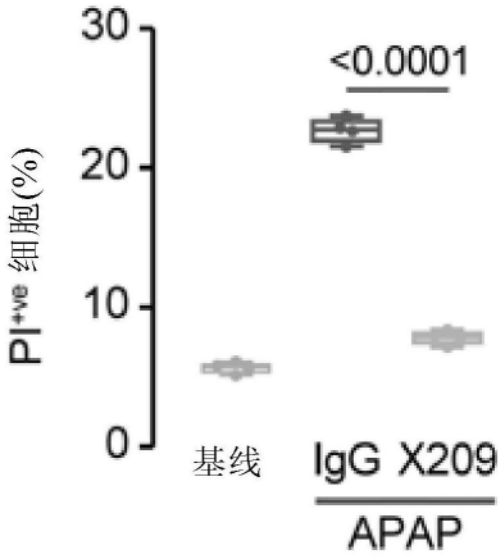

30
20
10
0
PI+ve 细胞(%)
<0.0001
基线
IgG
X209
APAP

图9J

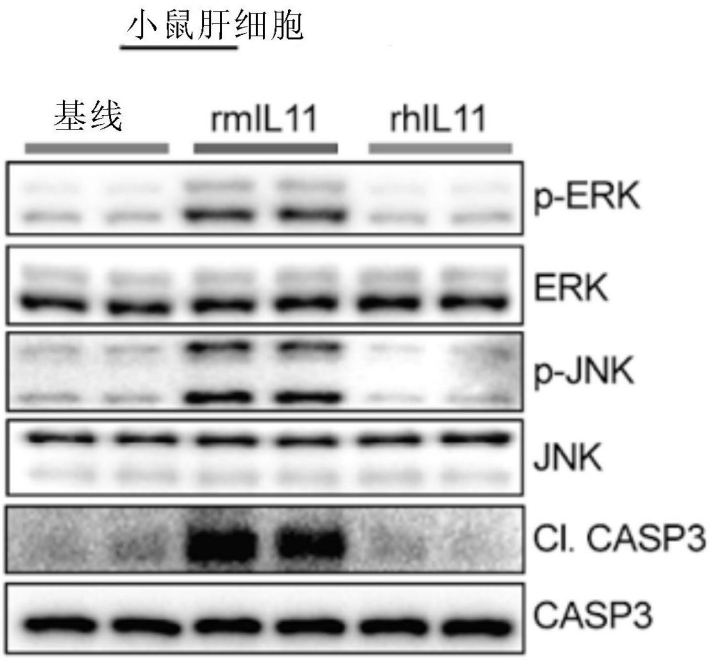

小鼠肝细胞
基线
rmIL11
rhIL11
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
Cl. CASP3
CASP3

图10A

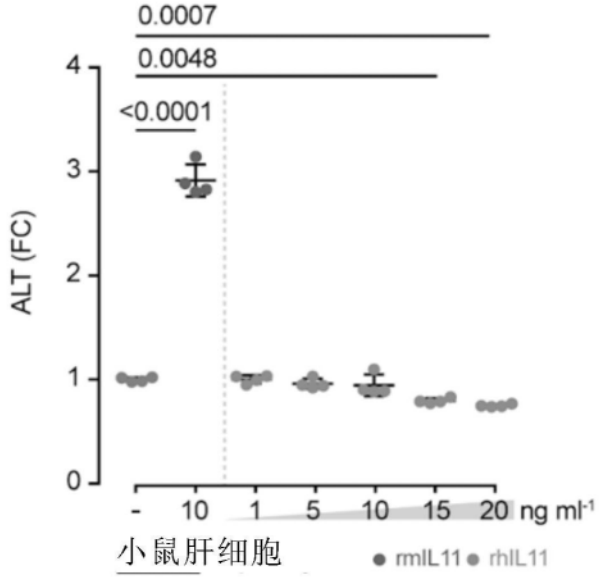

0.0007
0.0048
<0.0001
ALT (FC)
4
3
2
1
0
-
10
1
5
10
15
20
ng ml-1
小鼠肝细胞
rmIL11
rhIL11

图10B

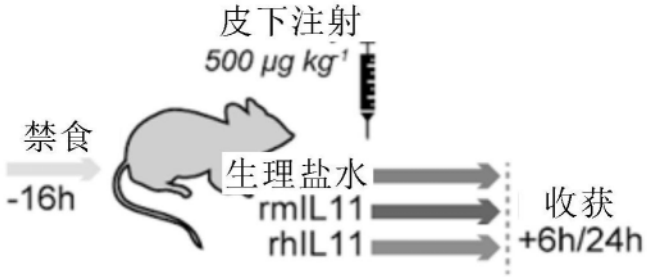

皮下注射
500 μg kg-1
禁食
-16h
生理盐水
rmIL11
rhIL11
收获
+6h/24h

图10C

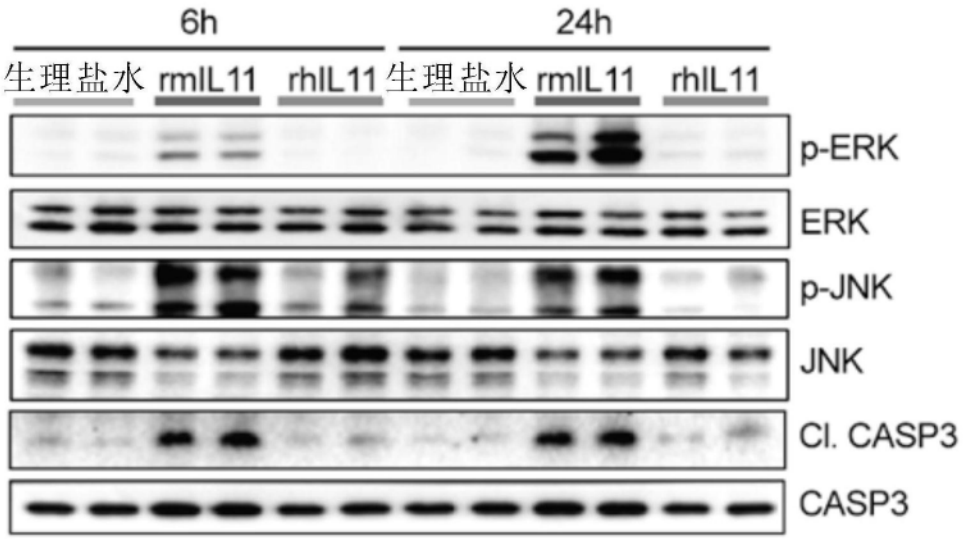

6h
24h
生理盐水
rmIL11
rhIL11
生理盐水
rmIL11
rhIL11
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
Cl. CASP3
CASP3

图10D

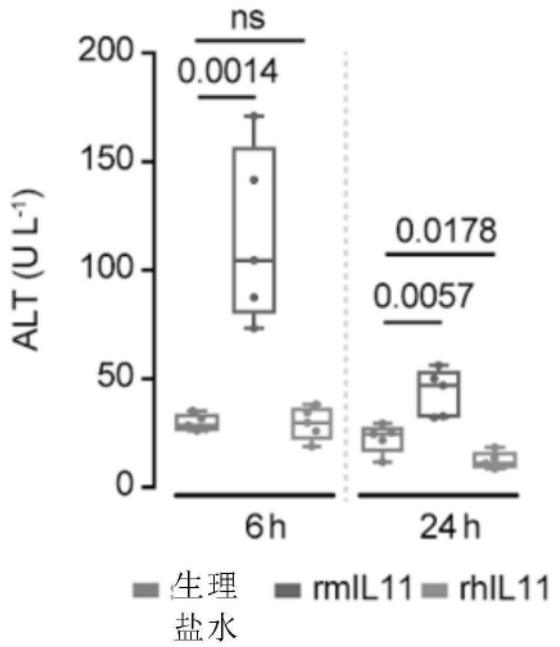

ns
0.0014
0.0178
0.0057
200
150
100
50
0
ALT (U L-1)
6h
24h
生理盐水
rmIL11
rhIL11

图10E

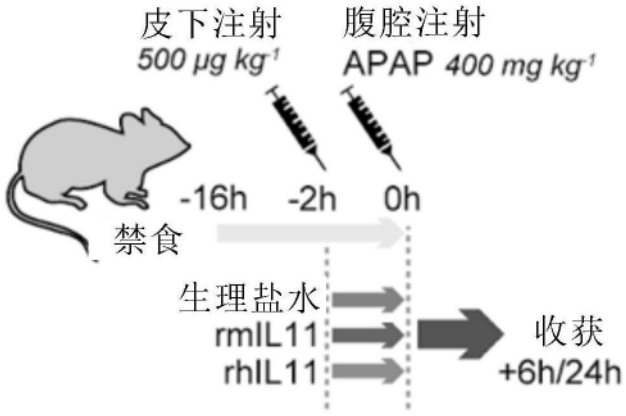

皮下注射
500 μg kg-1
腹腔注射
APAP 400 mg kg-1
-16h
-2h
0h
禁食
生理盐水
rmIL11
rhIL11
收获
+6h/24h

图10F

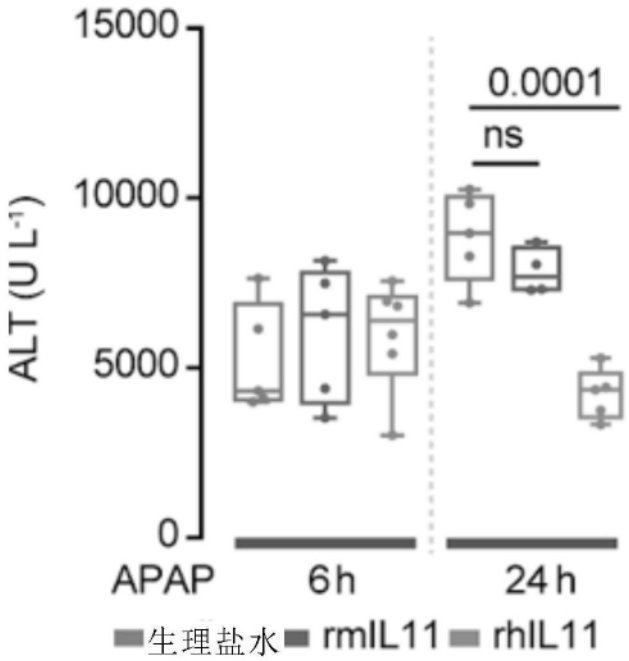

15000
10000
5000
0
ALT (U L-1)
0.0001
ns
APAP
6h
24h
生理盐水
rmIL11
rhIL11

图10G

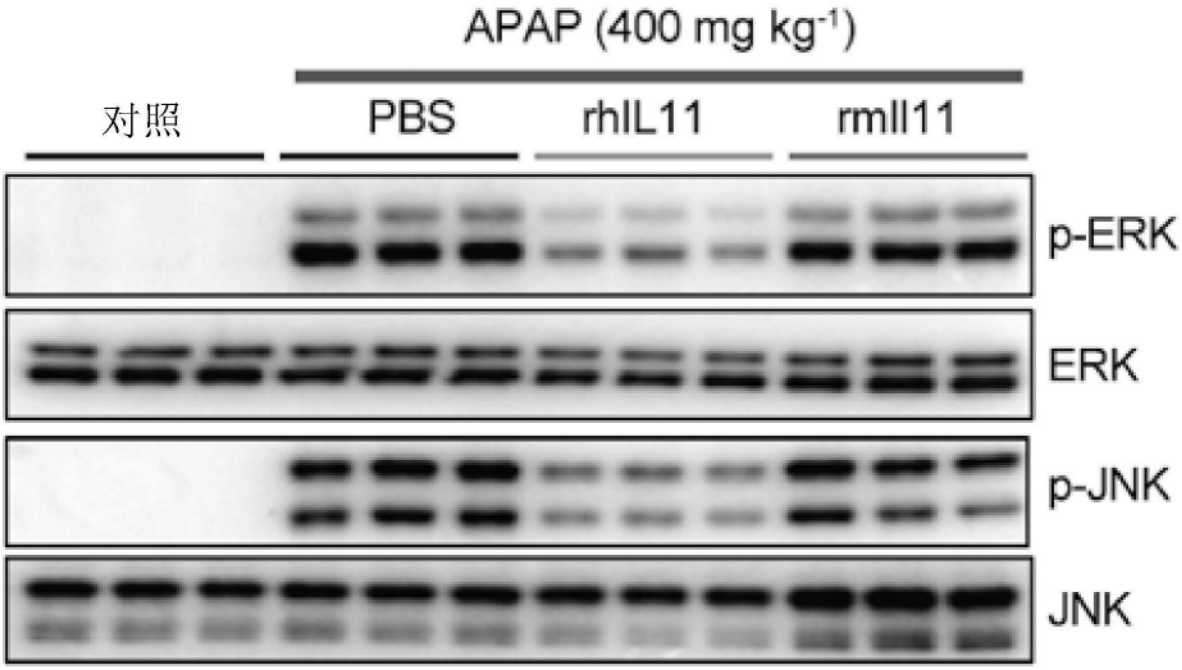

APAP (400 mg kg-1)
对照
PBS
rhIL11
rmIl11
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK

图10H

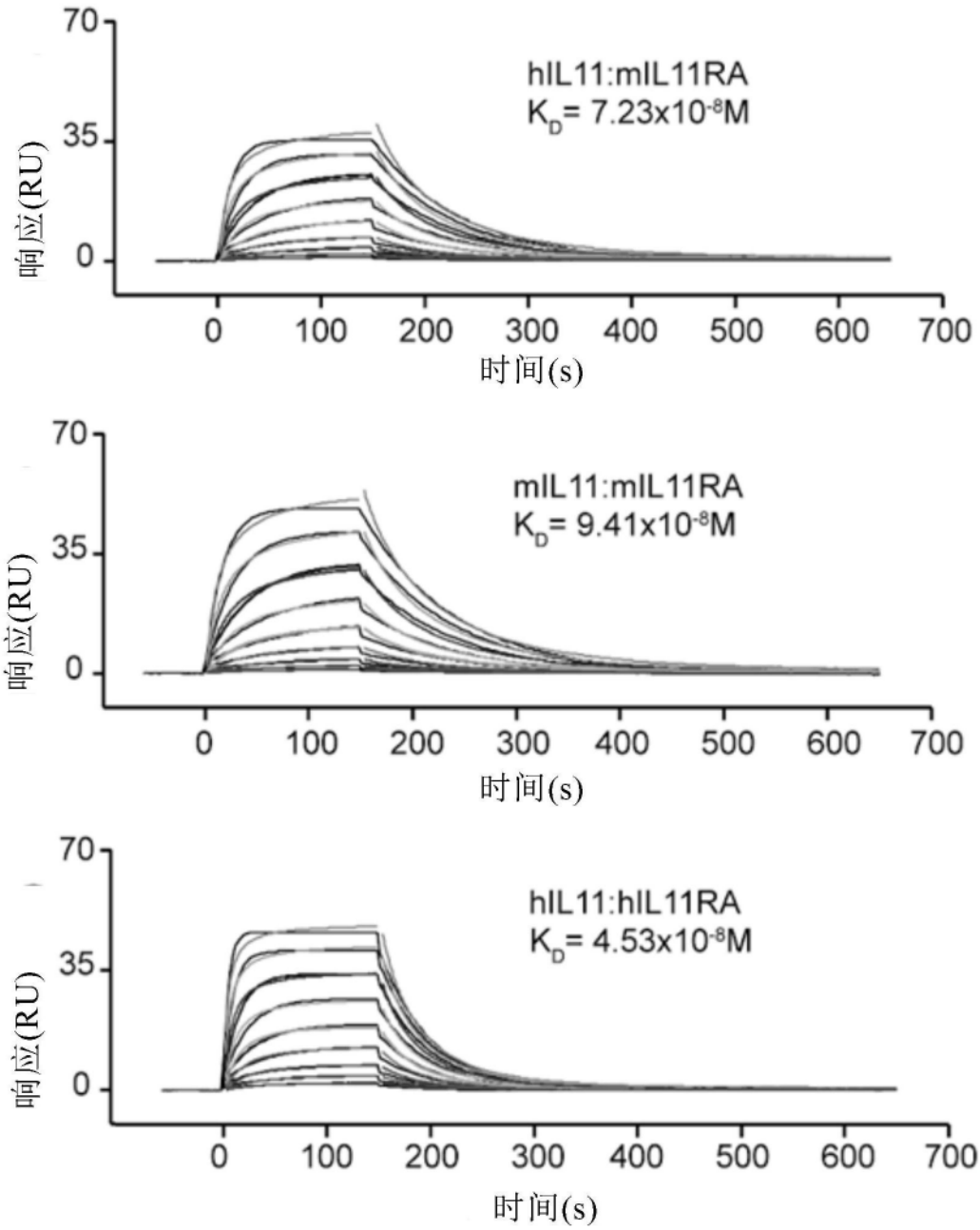

70
35
0
响应(RU)
hIL11:mIL11RA
K_D= 7.23x10^{-8}M
0 100 200 300 400 500 600 700
时间(s)
70
35
0
响应(RU)
mIL11:mIL11RA
K_D= 9.41x10^{-8}M
0 100 200 300 400 500 600 700
时间(s)
70
35
0
响应(RU)
hIL11:hIL11RA
K_D= 4.53x10^{-8}M
0 100 200 300 400 500 600 700
时间(s)

图10I

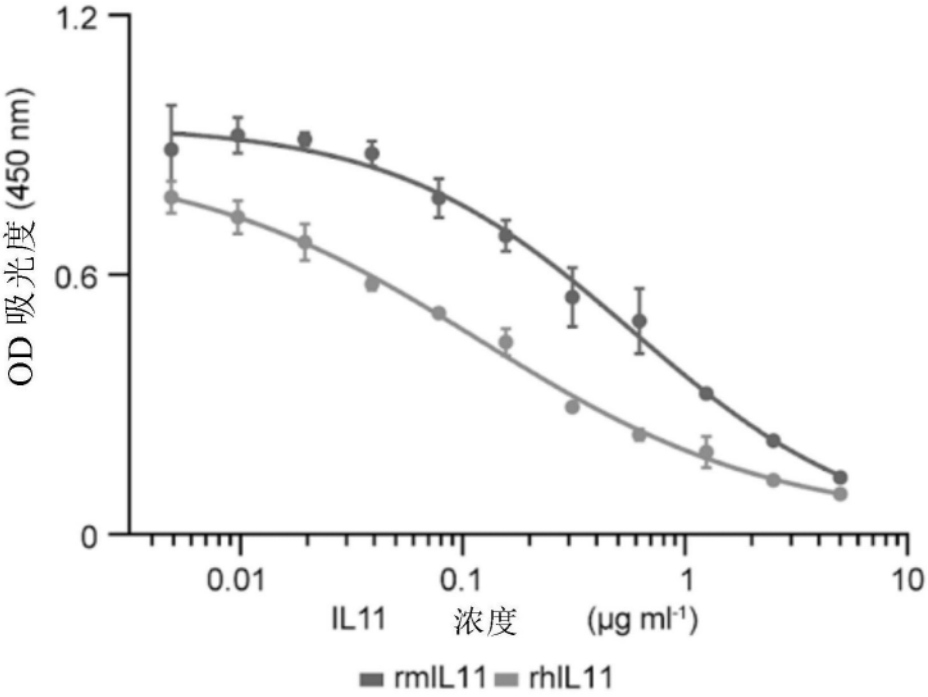

1.2
0.6
0
OD 吸光度 (450 nm)
0.01
0.1
1
10
IL11 浓度 (μg ml-1)
rmIL11
rhIL11

图10J

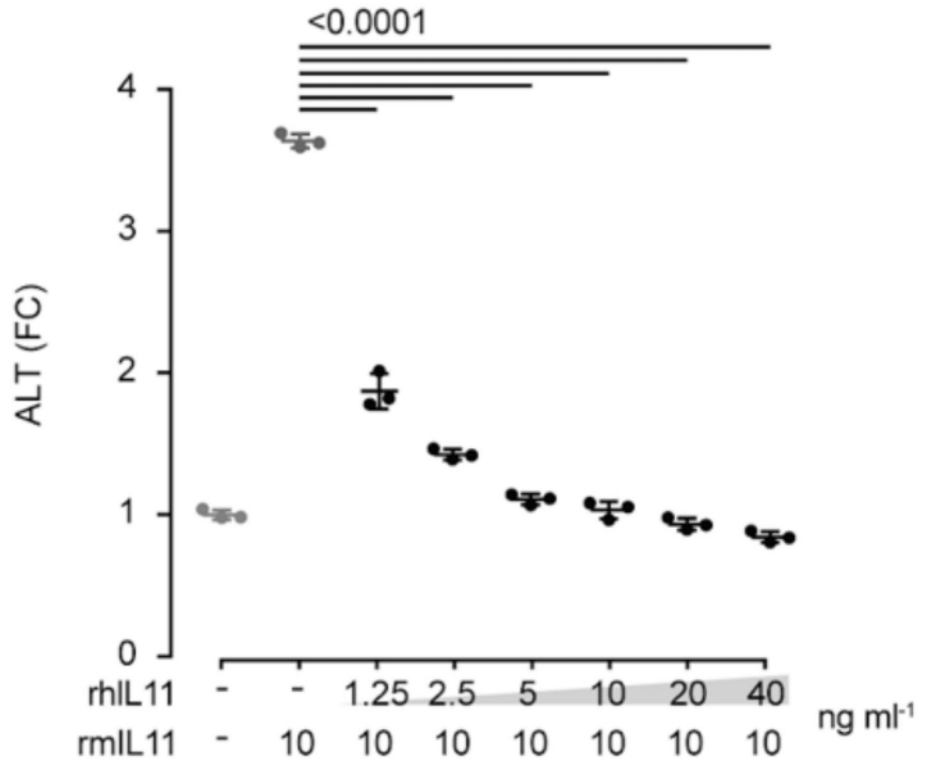

<0.0001
4
3
2
1
0
ALT (FC)
rhIL11 - - 1.25 2.5 5 10 20 40
rmIL11 - 10 10 10 10 10 10 10
ng ml-1

图10K

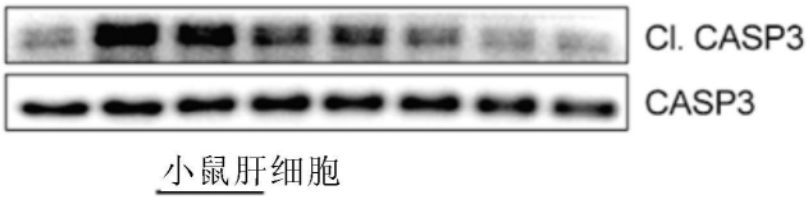


图10L

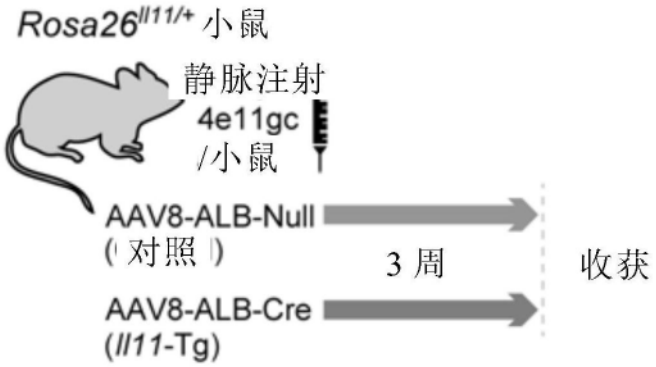


图11A

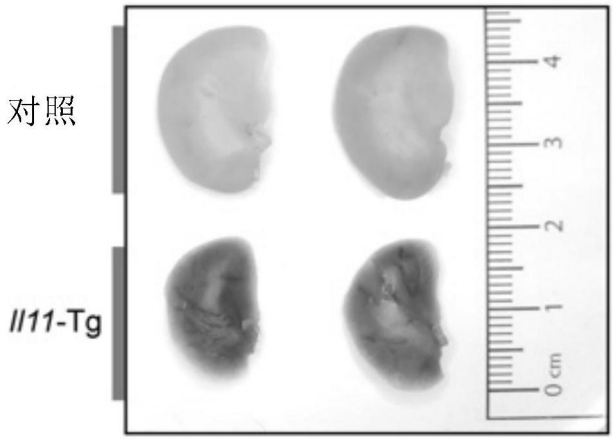


图11B

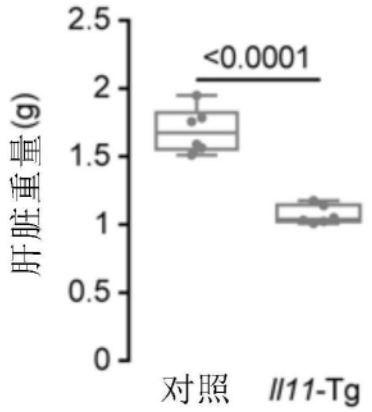


图11C

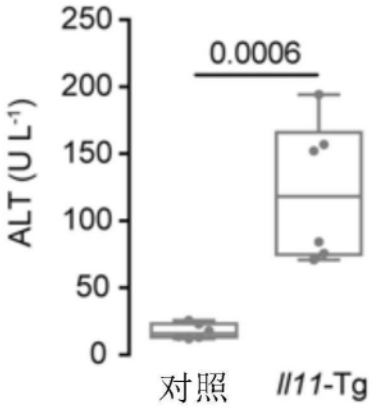


图11D

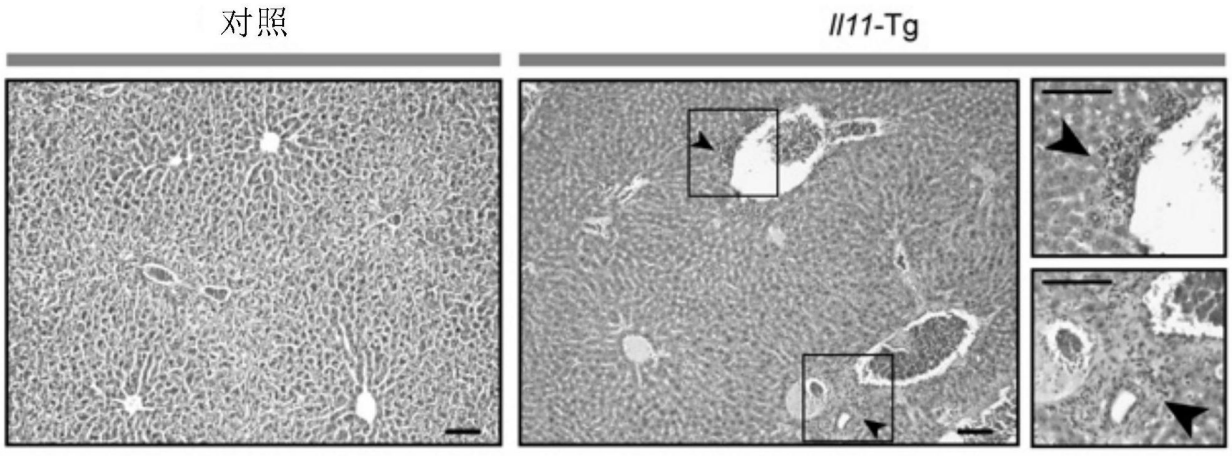


图11E

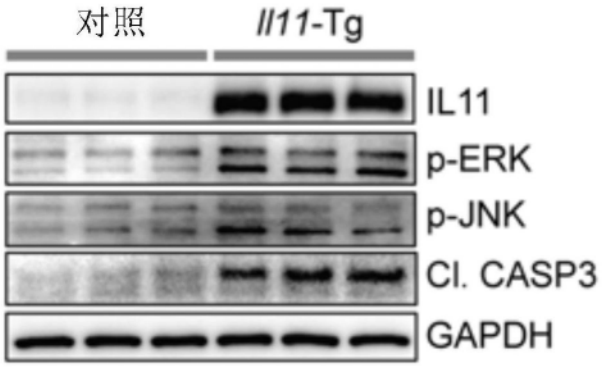


图11F

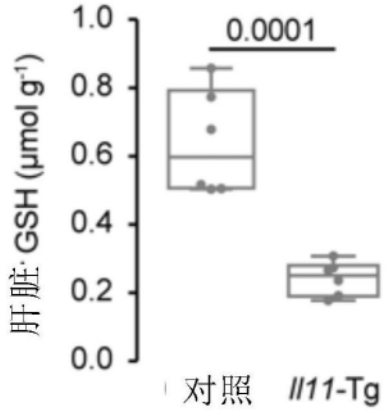


图11G

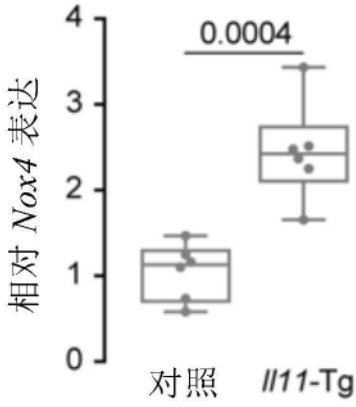


图11H

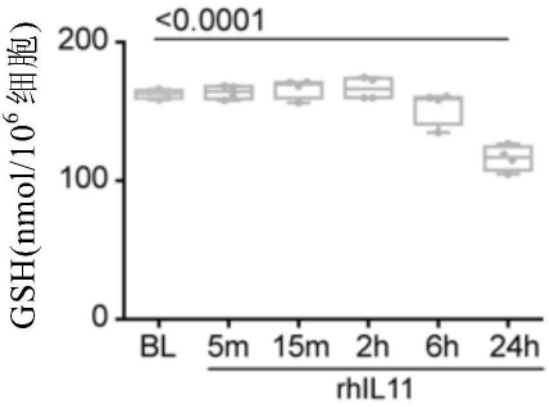


图11I

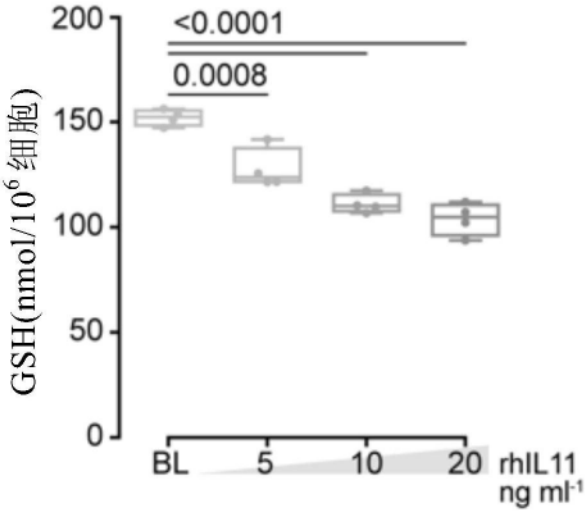


图11J

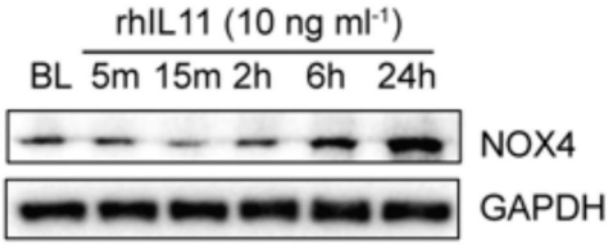


图11K

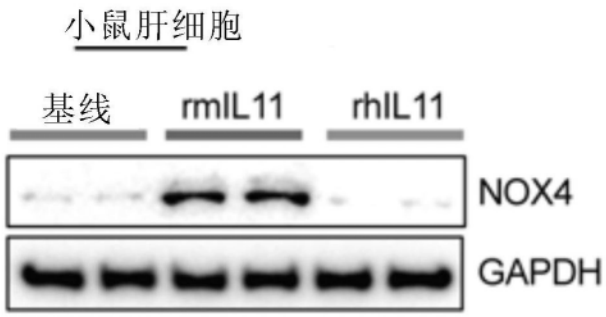


图11L

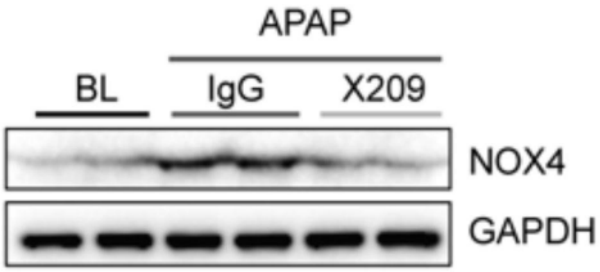


图11M

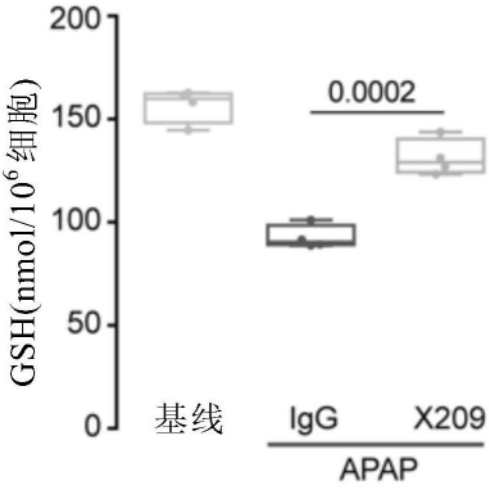


图11N

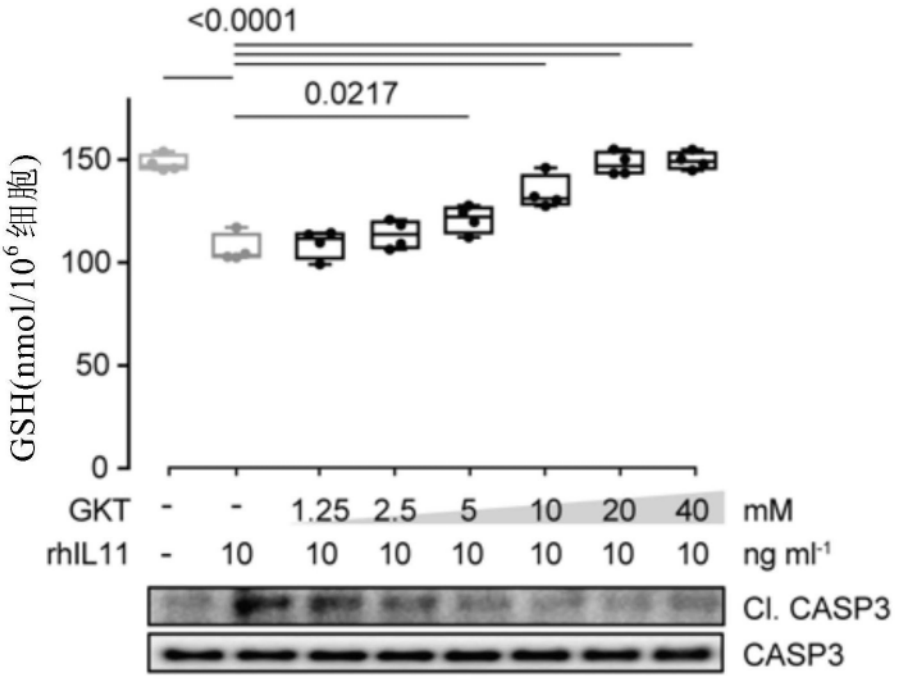

<0.0001
0.0217
GSH(nmol/10^6细胞)
150
100
50
0
GKT - - 1.25 2.5 5 10 20 40 mM
rhIL11 - 10 10 10 10 10 10 10 ng ml-1
Cl. CASP3
CASP3

图110

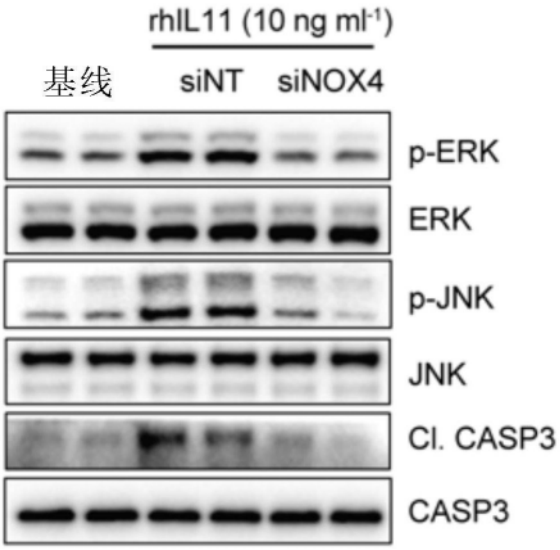

rhIL11 (10 ng ml-1)
基线
siNT
siNOX4
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
Cl. CASP3
CASP3

图11P

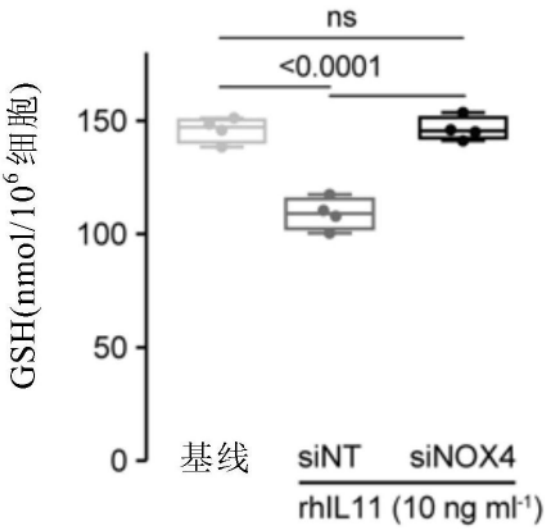


图11Q

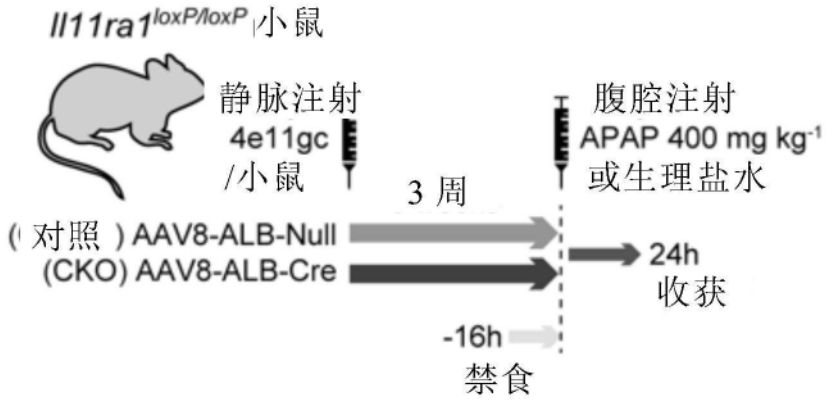


图12A

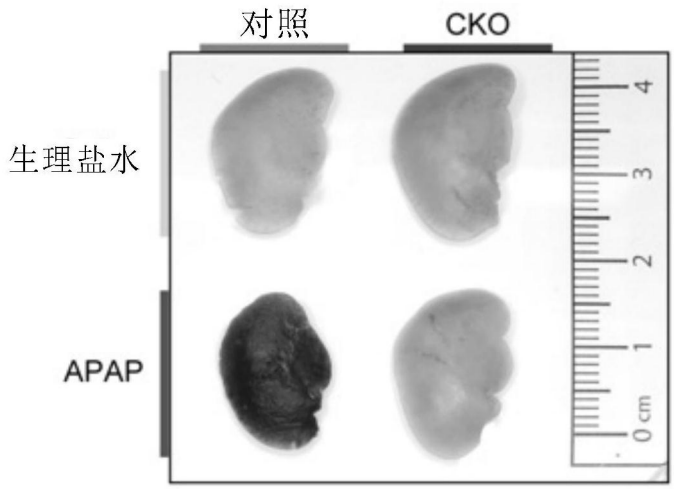


图12B

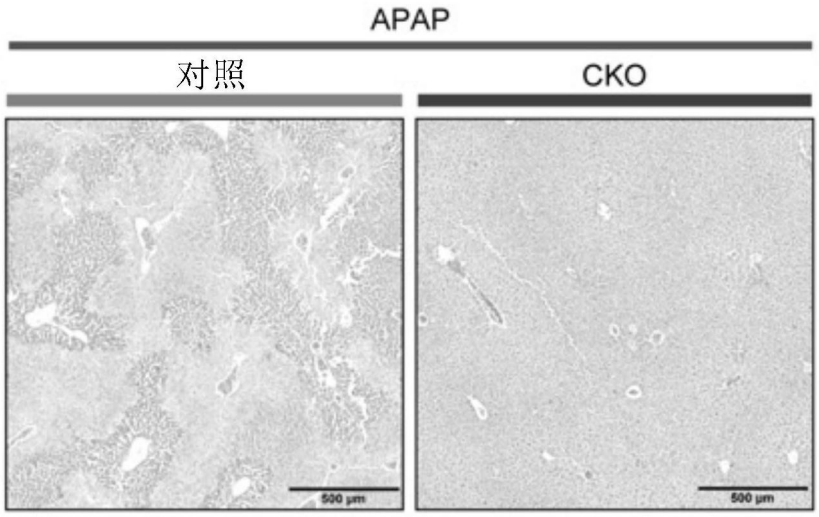


图12C

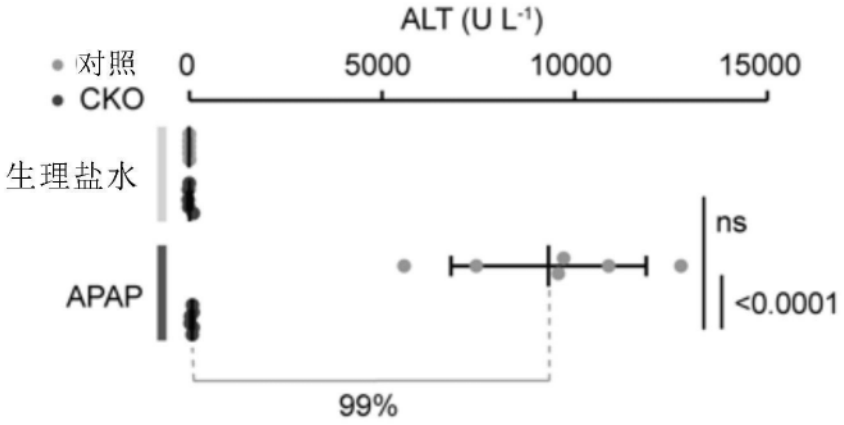


图12D

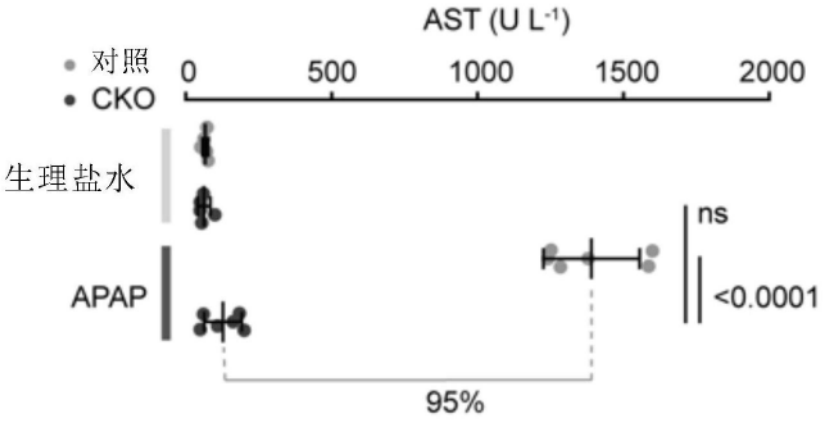


图12E

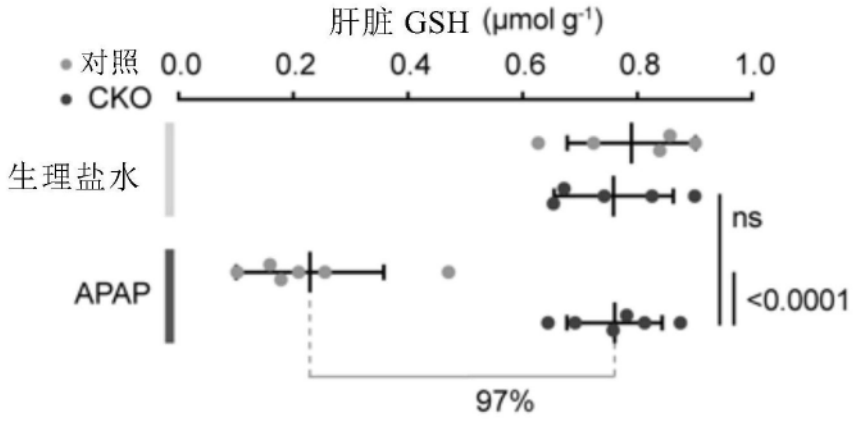


图12F

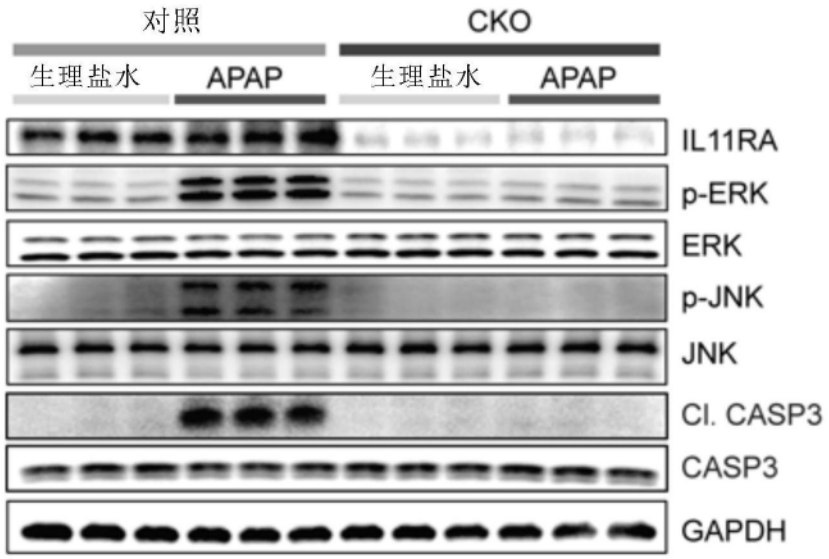


图12G

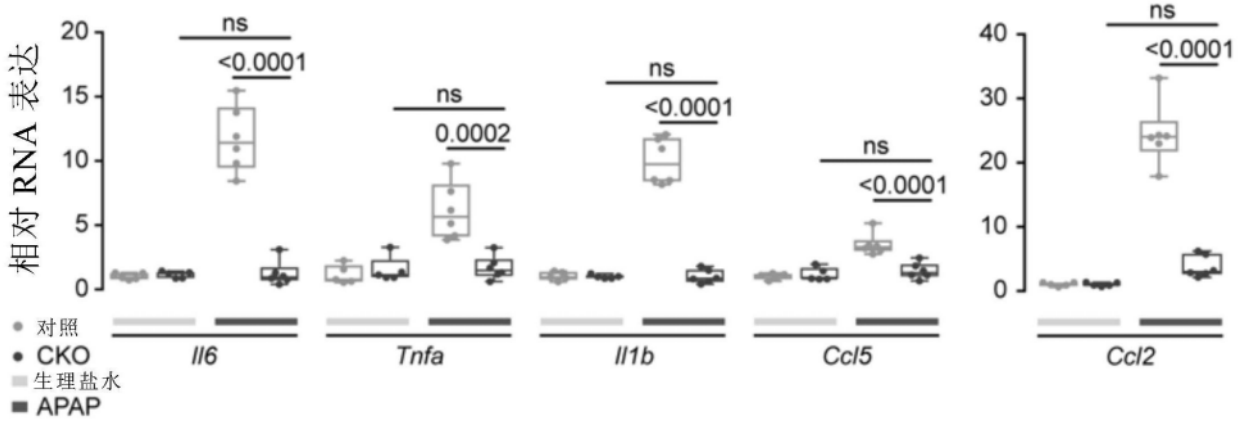


图12H

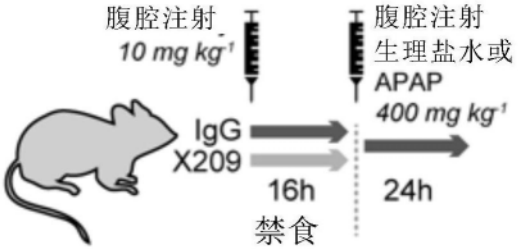


图13A

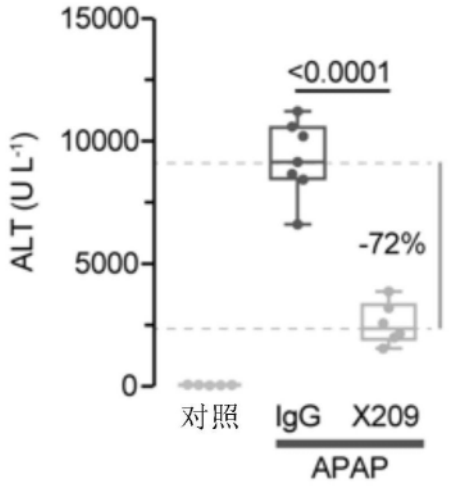


图13B

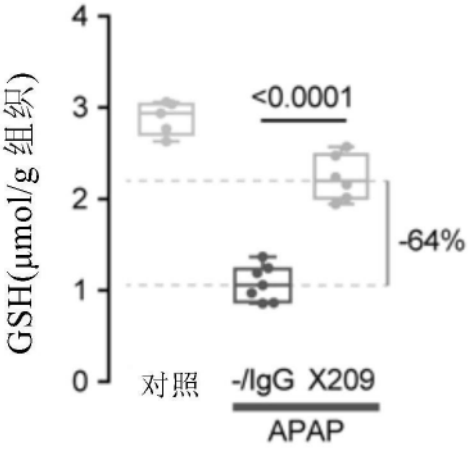


图13C

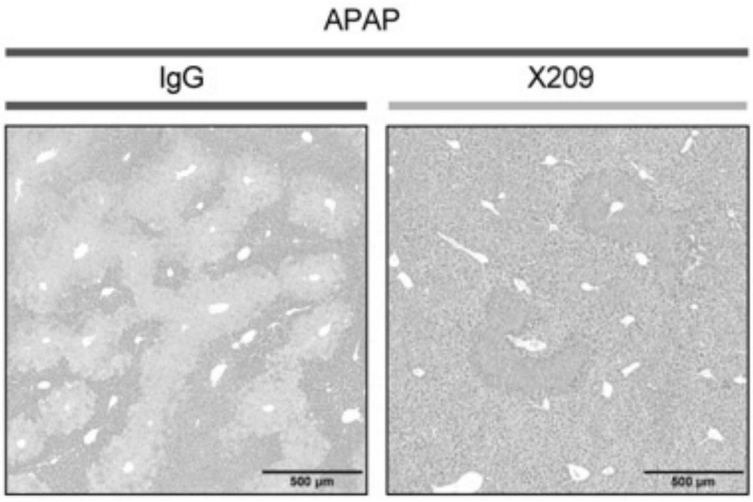


图13D

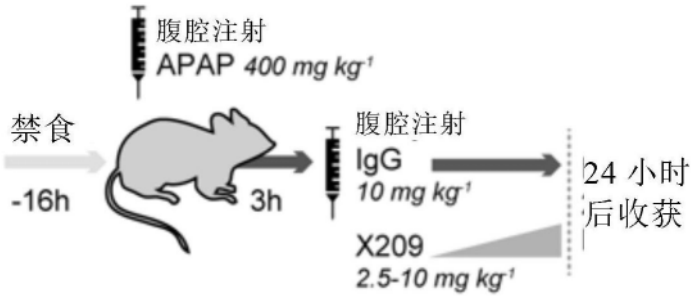


图13E

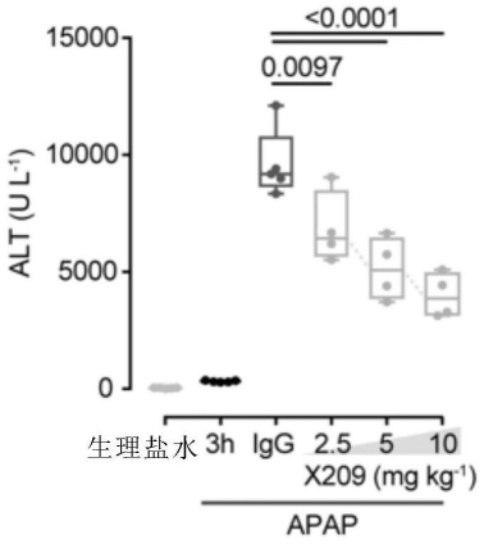


图13F

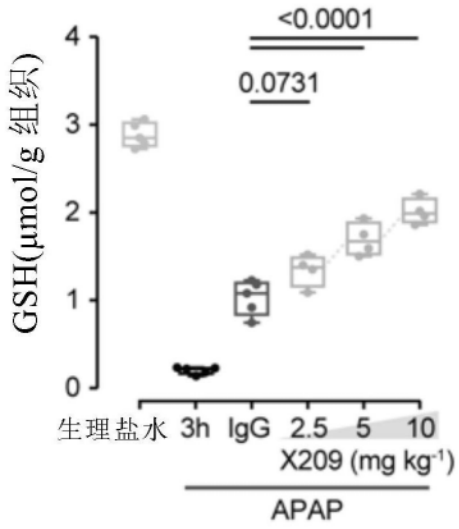


图13G

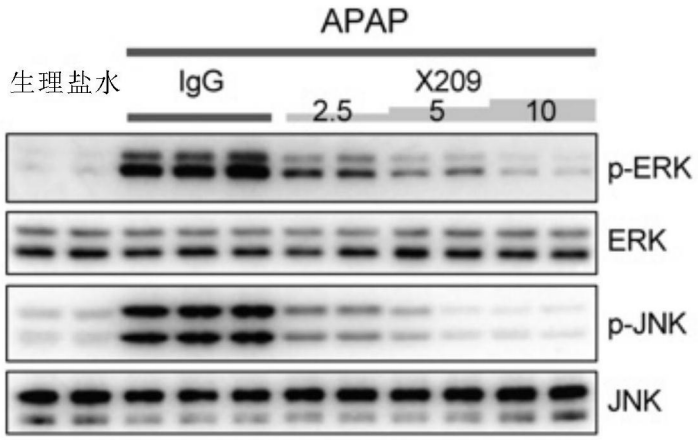


图13H

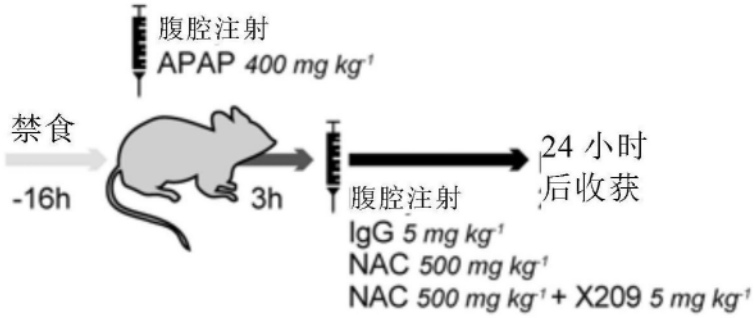


图13I

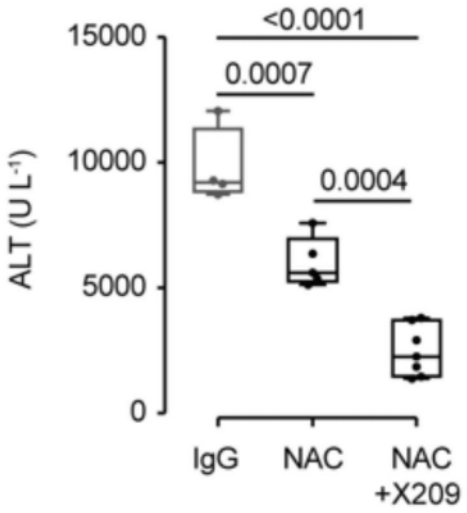

<0.0001
0.0007
0.0004
15000
10000
5000
0
ALT (U L-1)
IgG
NAC
NAC
+X209

图13J

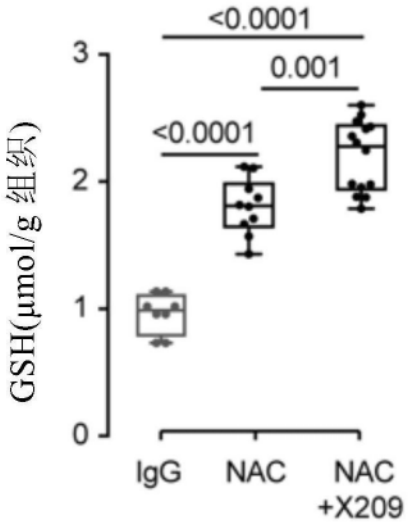

<0.0001
0.001
<0.0001
3
2
1
0
GSH(μmol/g 组织)
IgG
NAC
NAC
+X209

图13K

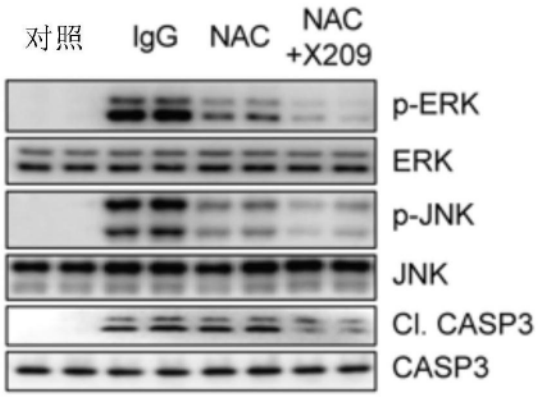

对照
IgG
NAC
NAC
+X209
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
Cl. CASP3
CASP3

图13L

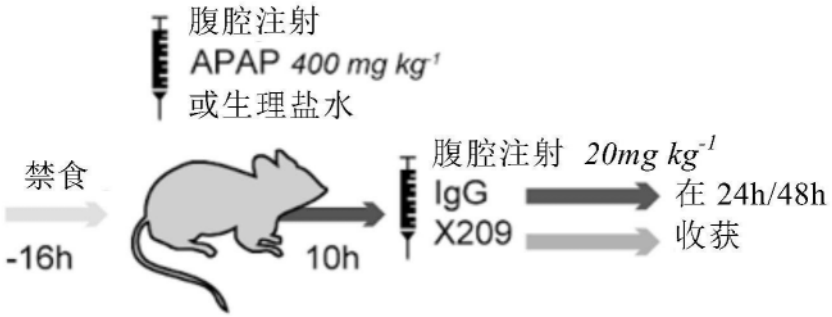

腹腔注射
APAP 400 mg kg-1
或生理盐水
禁食
-16h
10h
腹腔注射 20mg kg-1
IgG
X209
在 24h/48h
收获

图14A

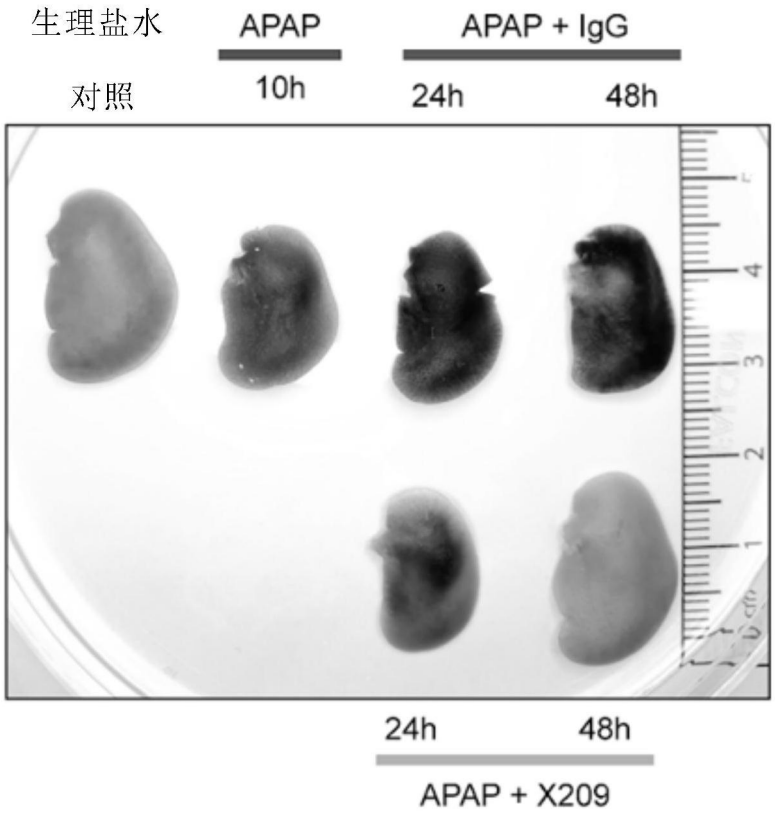


图14B

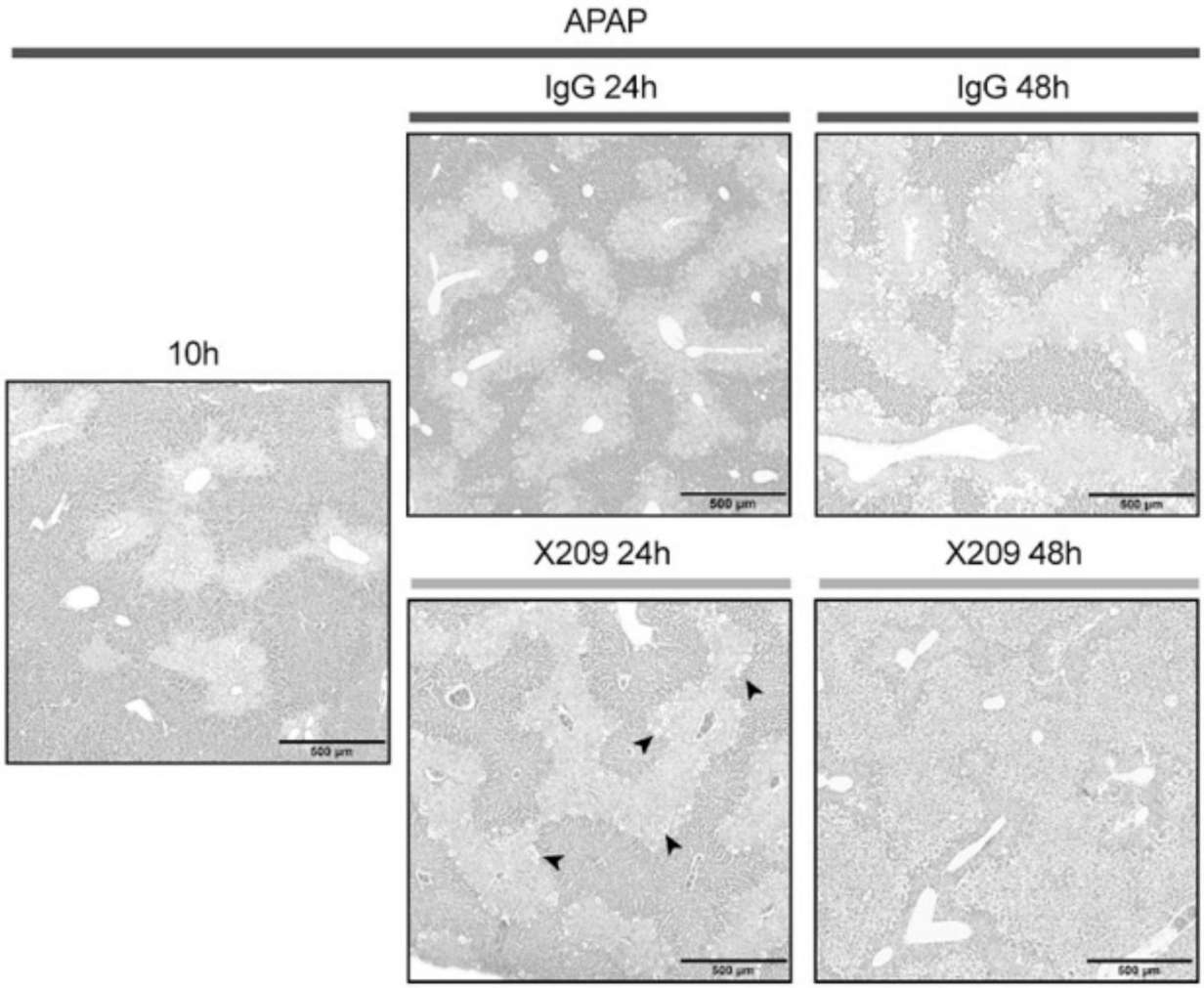


图14C

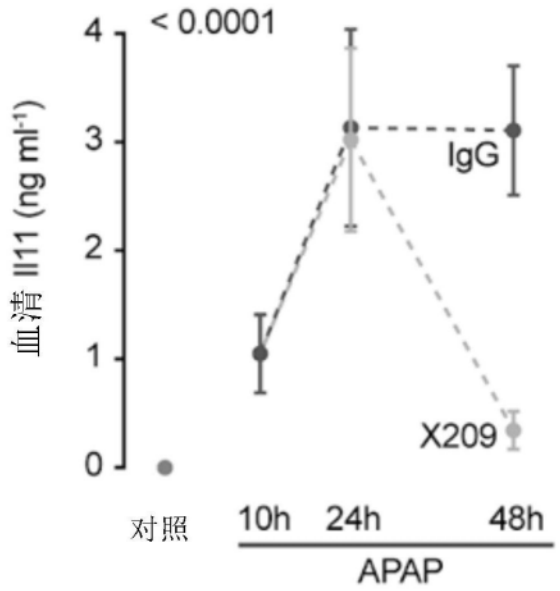

< 0.0001
血清 Il11 (ng ml-1)
4
3
2
1
0
IgG
X209
对照
10h
24h
48h
APAP

图14D

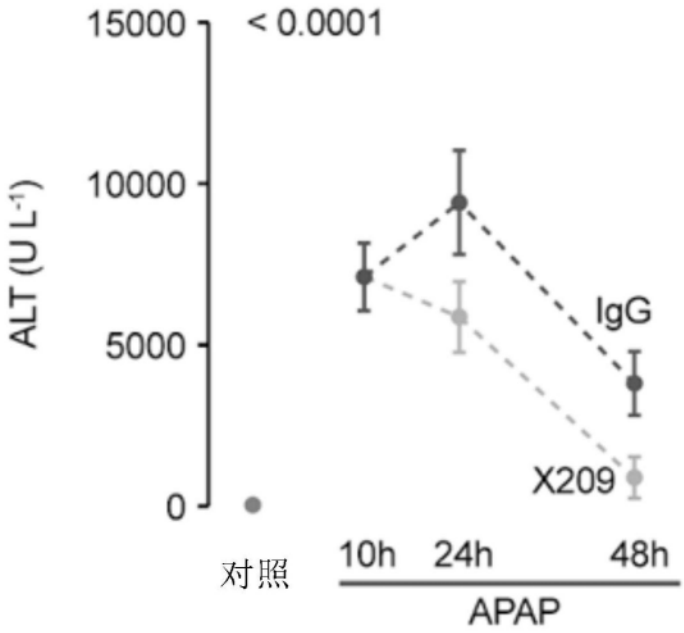

15000
< 0.0001
ALT (U L-1)
10000
5000
0
IgG
X209
对照
10h
24h
48h
APAP

图14E

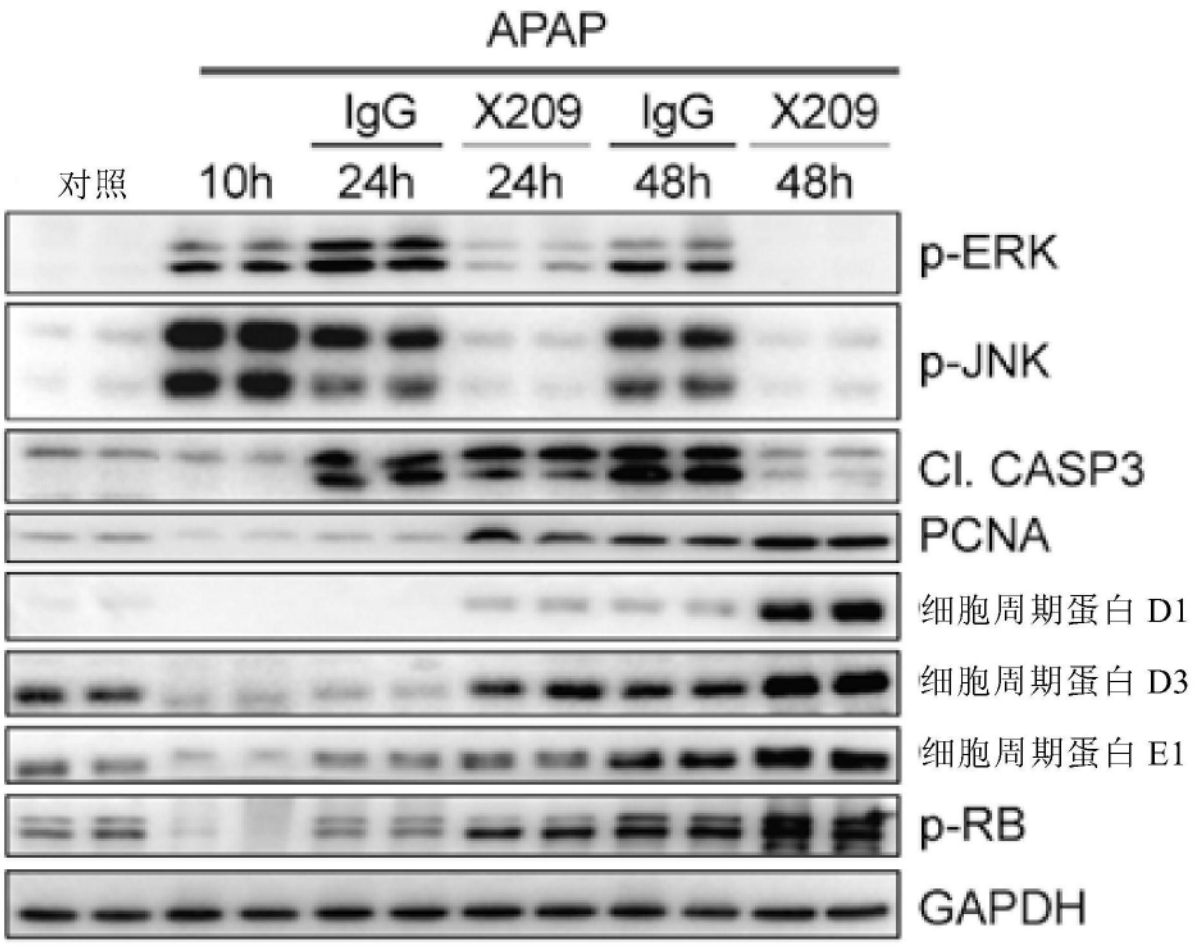

APAP
IgG
X209
IgG
X209
对照
10h
24h
24h
48h
48h
p-ERK
p-JNK
Cl. CASP3
PCNA
细胞周期蛋白 D1
细胞周期蛋白 D3
细胞周期蛋白 E1
p-RB
GAPDH

图14F

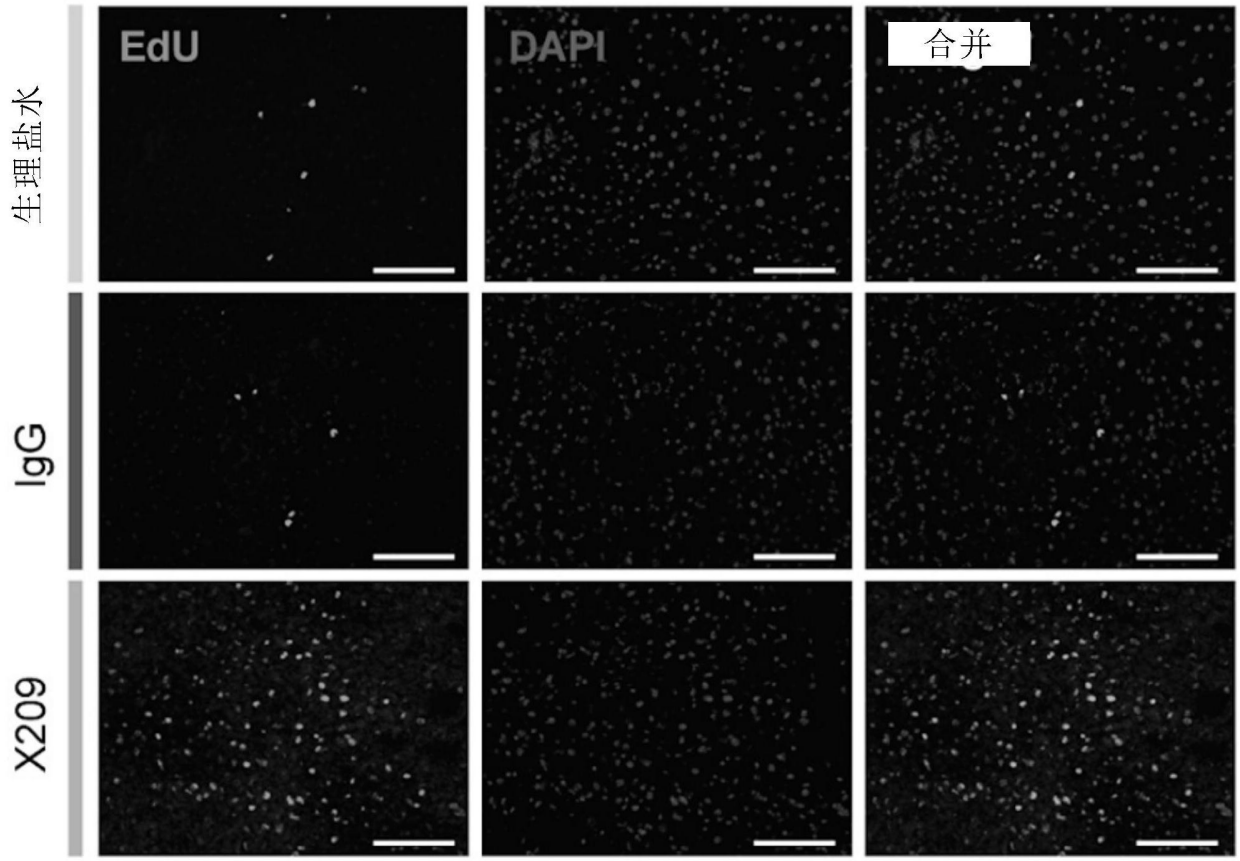

EdU
DAPI
合并
生理盐水
IgG
X209

图14G

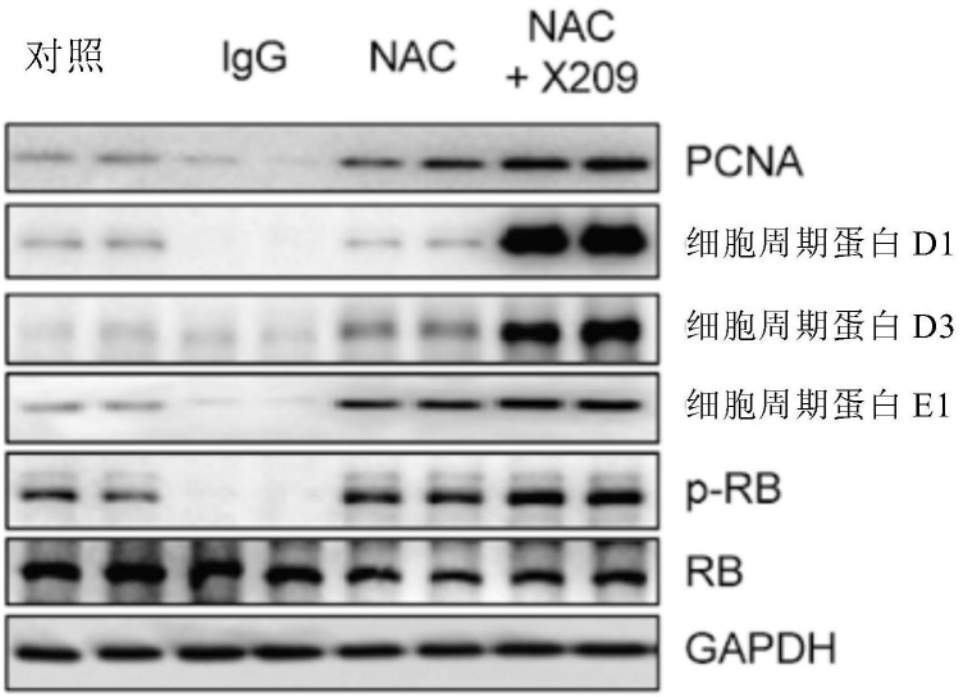

对照
IgG
NAC
NAC
+ X209
PCNA
细胞周期蛋白 D1
细胞周期蛋白 D3
细胞周期蛋白 E1
p-RB
RB
GAPDH

图14H

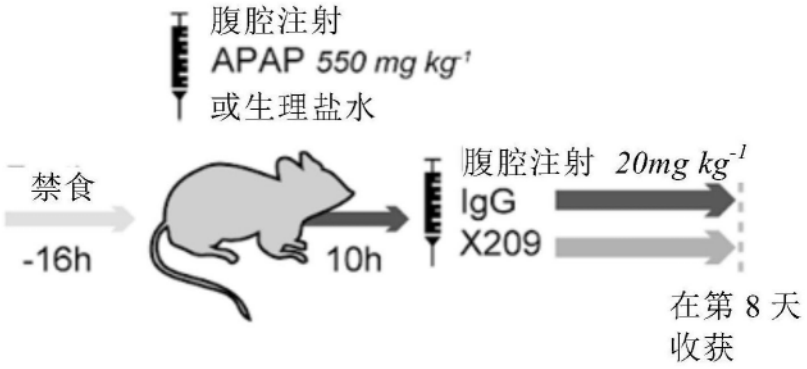

腹腔注射
APAP 550 mg kg-1
或生理盐水
禁食
-16h
10h
腹腔注射 20mg kg-1
IgG
X209
在第 8 天
收获

图14I

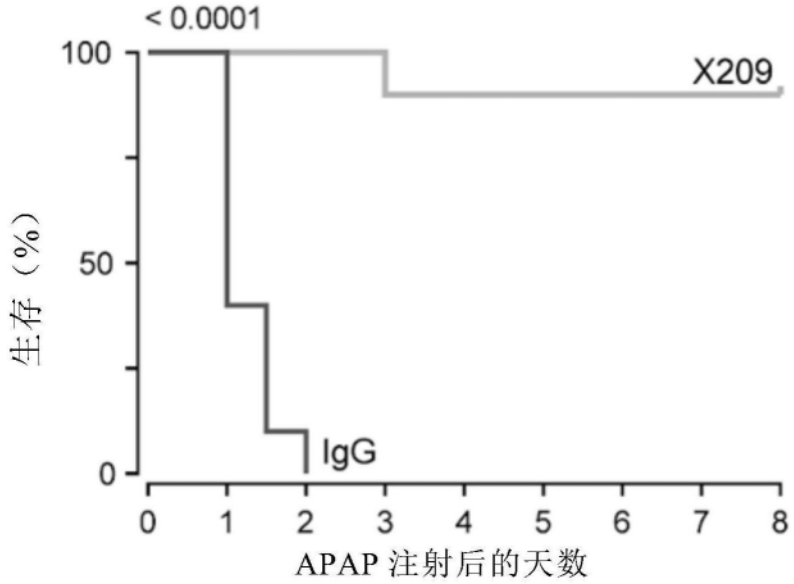

< 0.0001
100
50
0
生存（%）
X209
IgG
0
1
2
3
4
5
6
7
8
APAP 注射后的天数

图14J

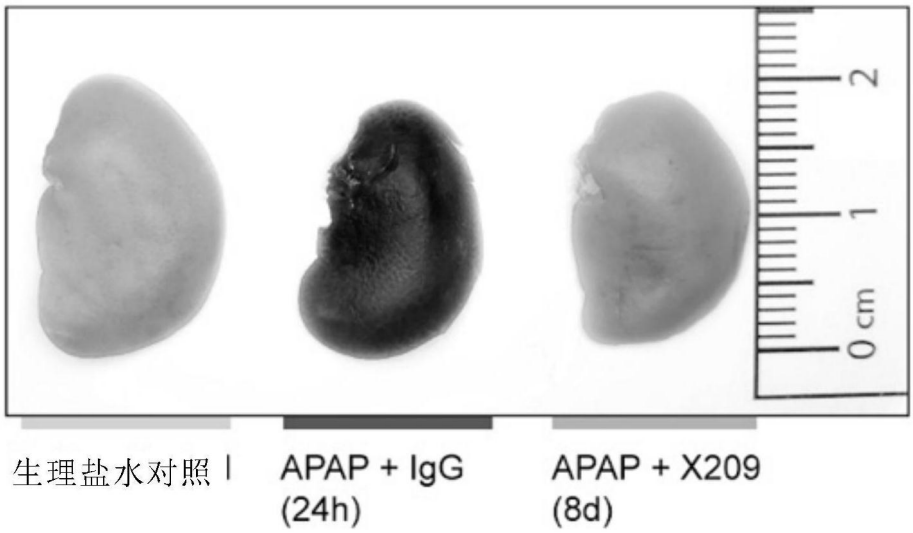

2
1
0 cm
生理盐水对照 I
APAP + IgG
(24h)
APAP + X209
(8d)

图14K

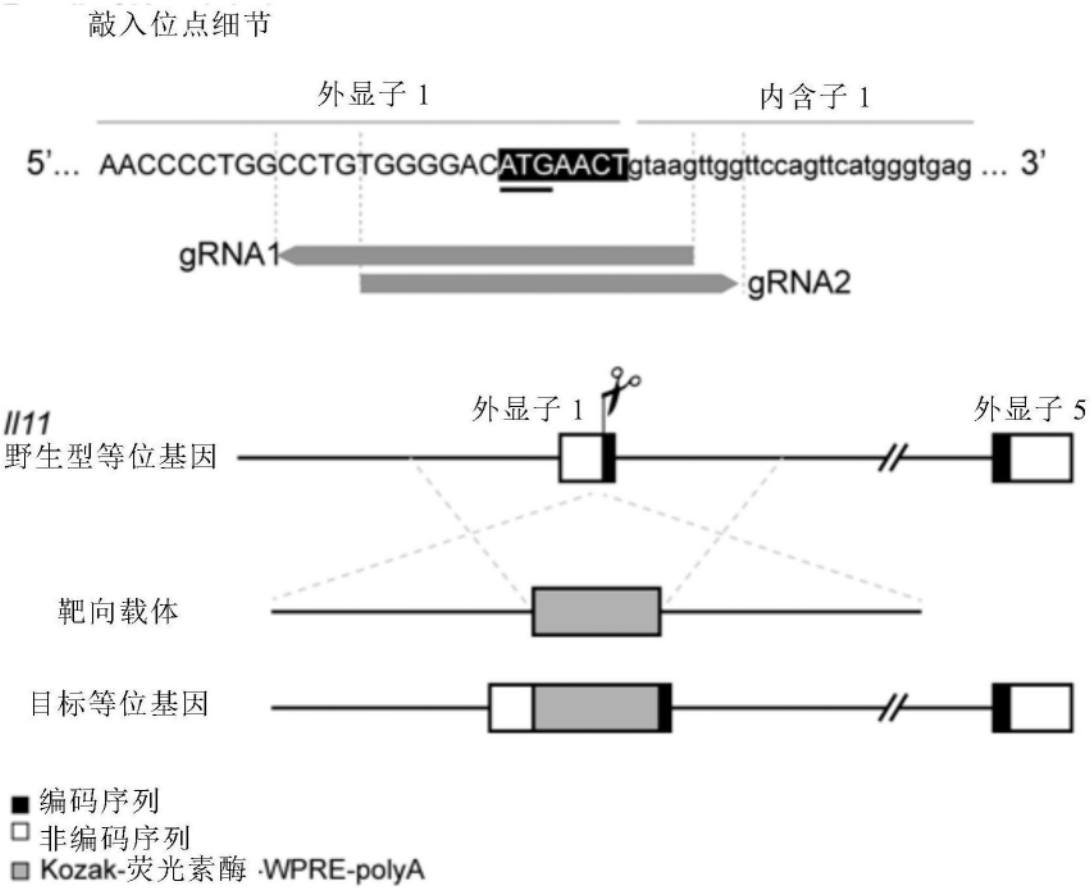

敲入位点细节
外显子 1
内含子 1
5'... AACCCCTGGCCTGTGGGGACATGAACTgtaagttggttccagttcatgggtgag ... 3'
gRNA1
gRNA2
Il11
野生型等位基因
外显子 1
外显子 5
靶向载体
目标等位基因
编码序列
非编码序列
Kozak-荧光素酶 -WPRE-polyA

图15

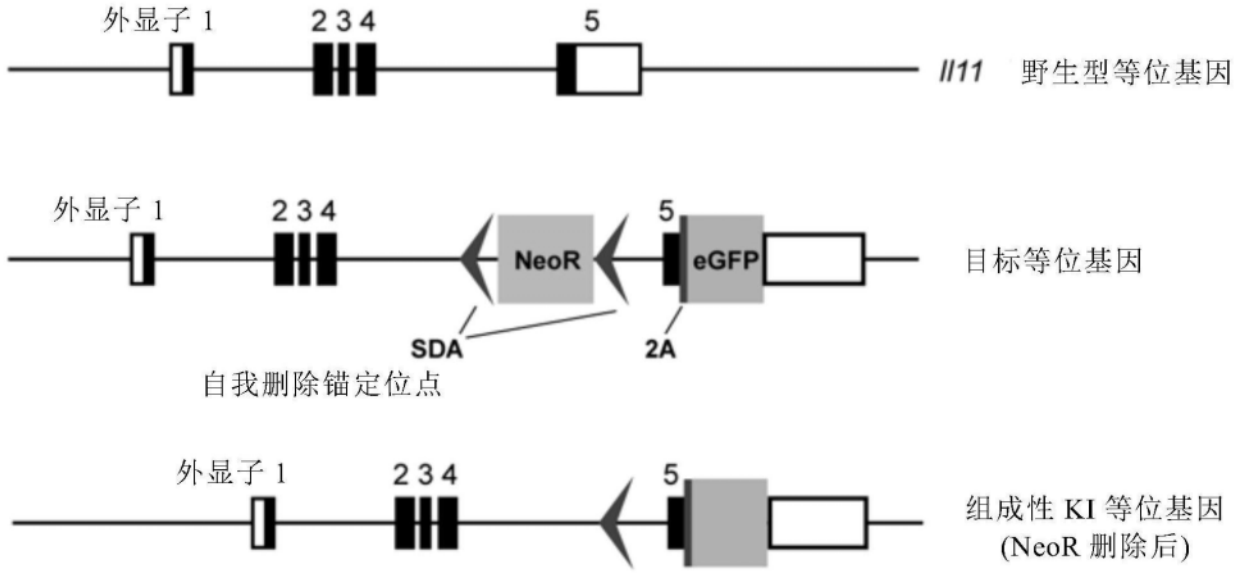

外显子 1
2 3 4
5
Il11
野生型等位基因
外显子 1
2 3 4
5
NeoR
eGFP
目标等位基因
SDA
2A
自我删除锚定位点
外显子 1
2 3 4
5
组成性 KI 等位基因
(NeoR 删除后)

图16

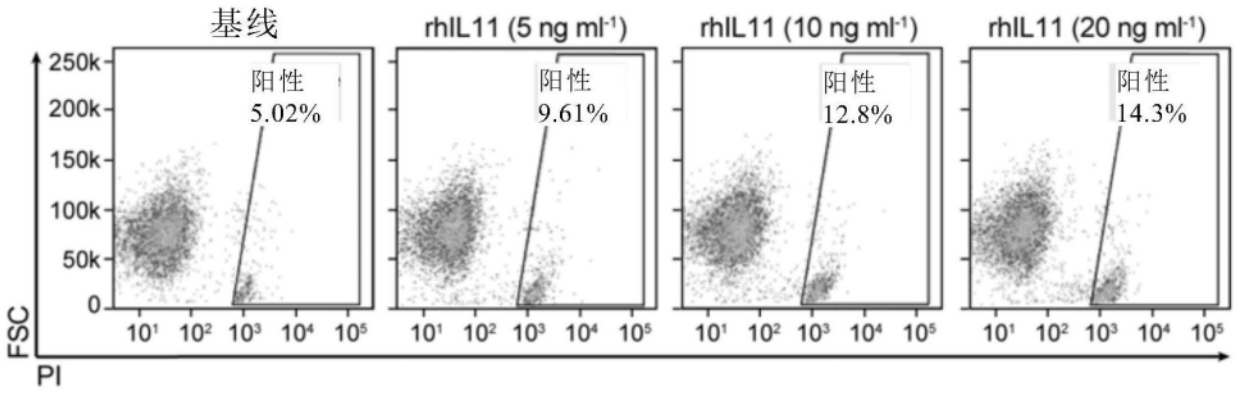

基线
rhIL11 (5 ng ml-1)
rhIL11 (10 ng ml-1)
rhIL11 (20 ng ml-1)
阳性
5.02%
阳性
9.61%
阳性
12.8%
阳性
14.3%
250k
200k
150k
100k
50k
0
FSC
PI
10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵

图17A

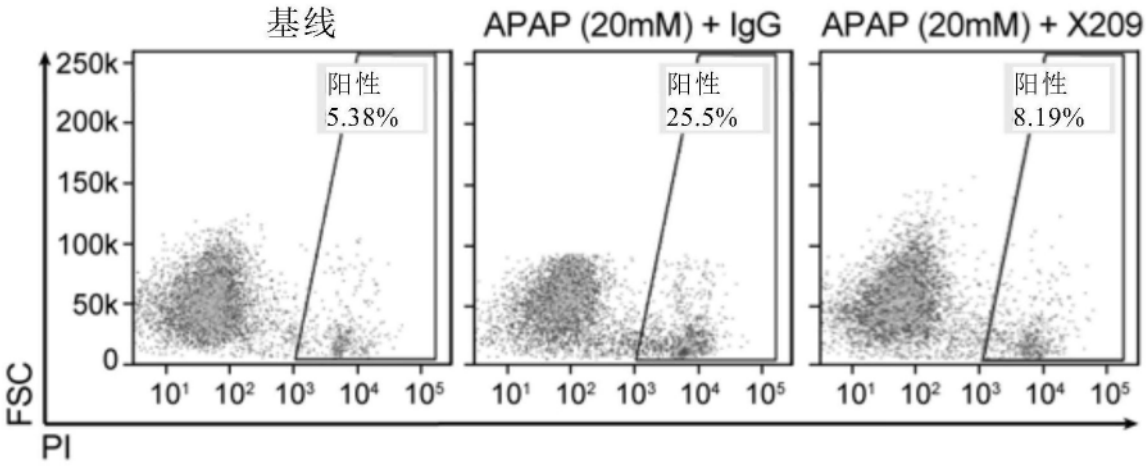

基线
APAP (20mM) + IgG
APAP (20mM) + X209
阳性
5.38%
阳性
25.5%
阳性
8.19%
250k
200k
150k
100k
50k
0
FSC
PI
10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵

图17B

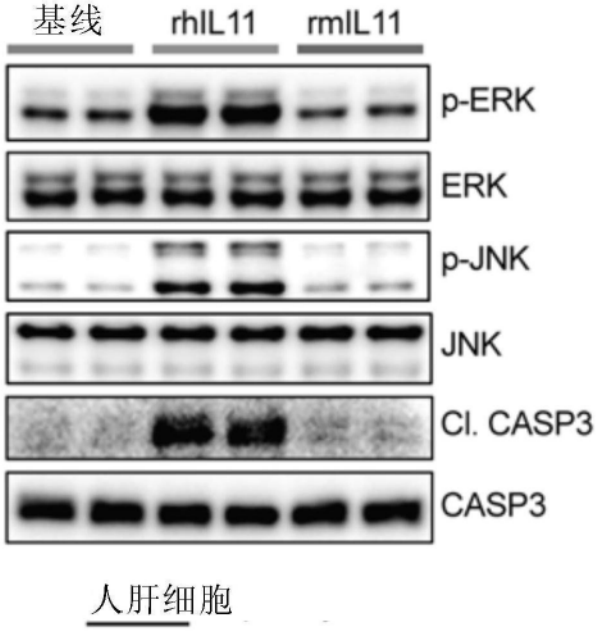

基线
rhIL11
rmIL11
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
Cl. CASP3
CASP3
人肝细胞

图18A

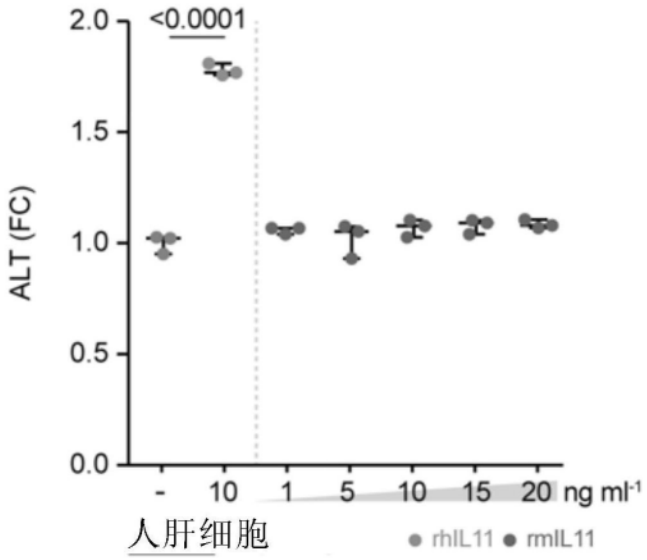

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ALT (FC)
<0.0001
- 10 1 5 10 15 20 ng ml-1
人肝细胞
rhIL11 rmIL11

图18B

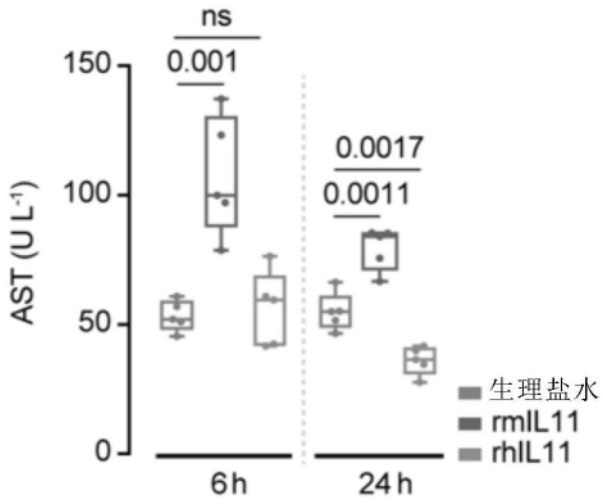

ns
0.001
0.0017
0.0011
150
100
50
0
AST (U L-1)
生理盐水
rmIL11
rhIL11
6h
24h

图18C

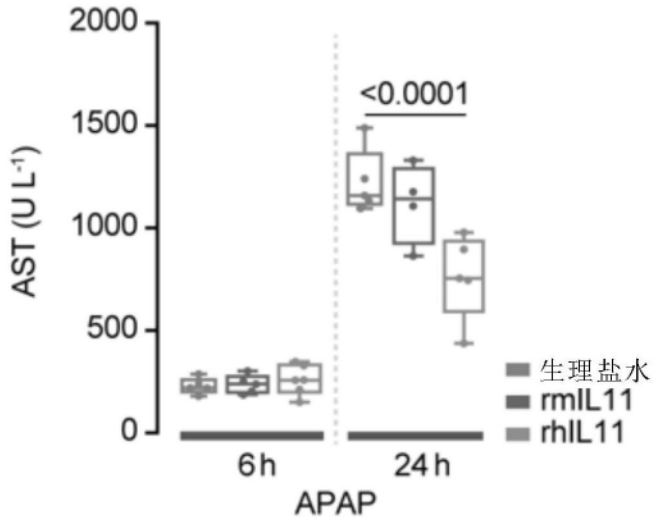


图18D

配体	分析物	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
hIL11	mIL11RA	$1.66x10^5$	$1.20x10^{-2}$	$7.23x10^{-8}$
mIL11	mIL11RA	$1.22x10^5$	$1.15x10^{-2}$	$9.41x10^{-8}$
hIL11	hIL11RA	$4.51x10^5$	$2.04x10^{-2}$	$4.53x10^{-8}$

图18E

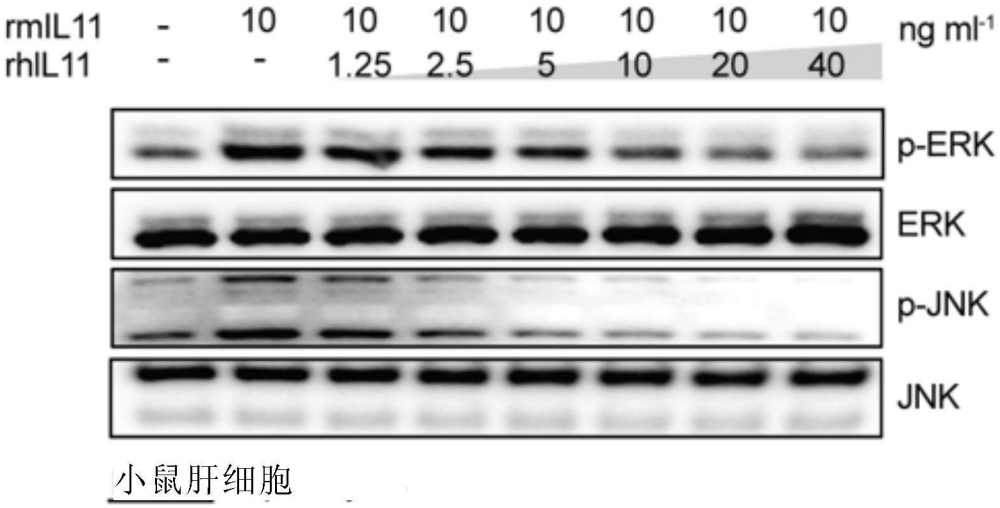


图18F

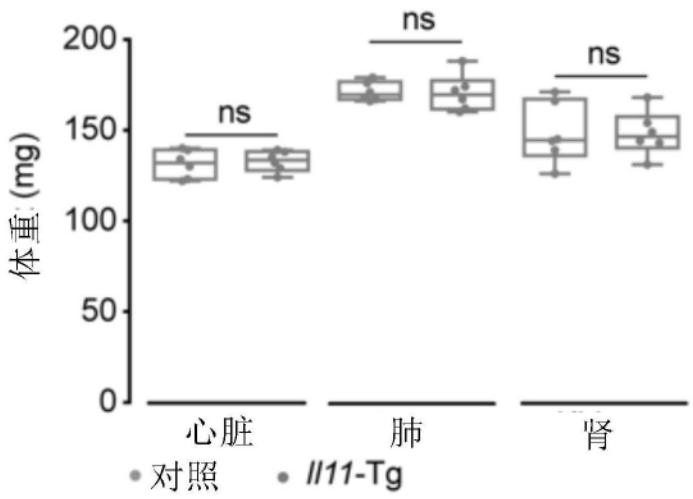

ns
ns
ns
200
150
100
50
0
体重 (mg)
心脏
肺
肾
对照
Il11-Tg

图19A

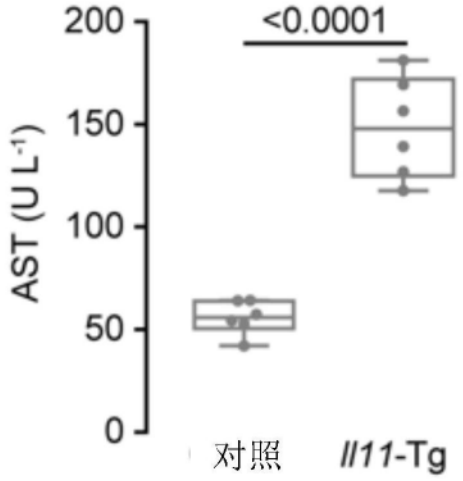

<0.0001
200
150
100
50
0
AST (U L-1)
对照
Il11-Tg

图19B

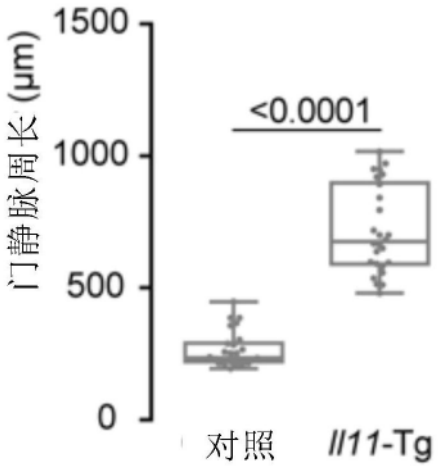


图19C

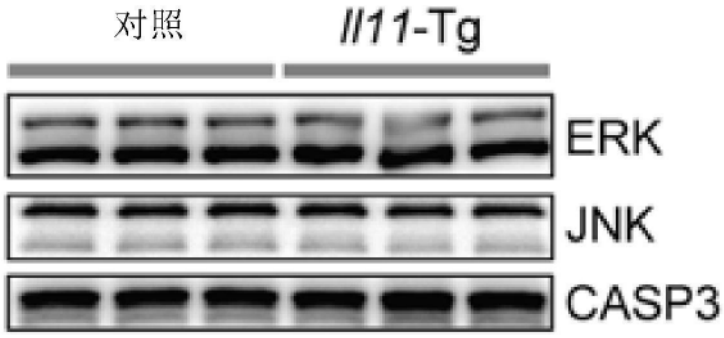


图19D

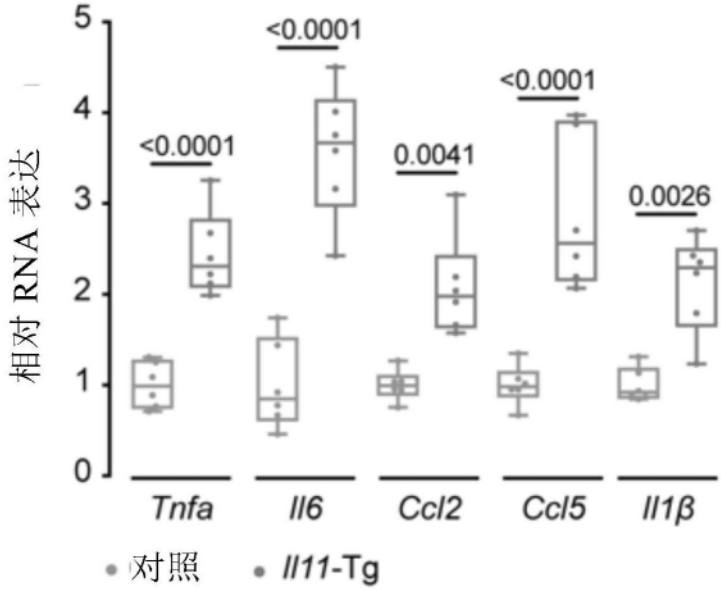


图19E

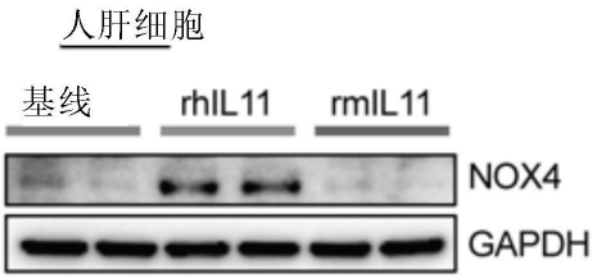


图20A

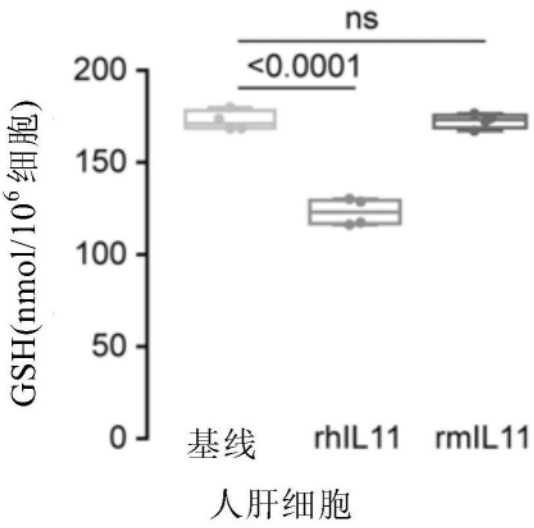


图20B

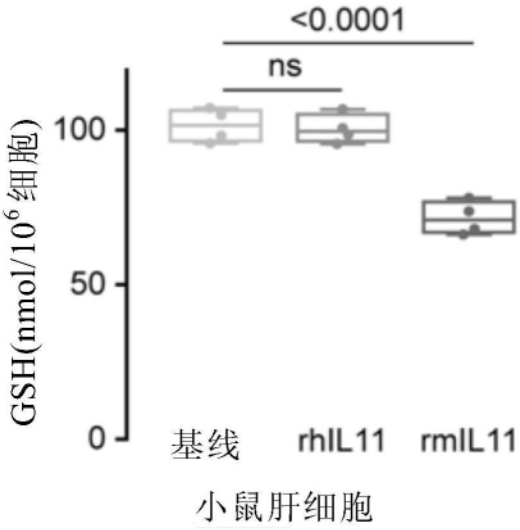


图20C

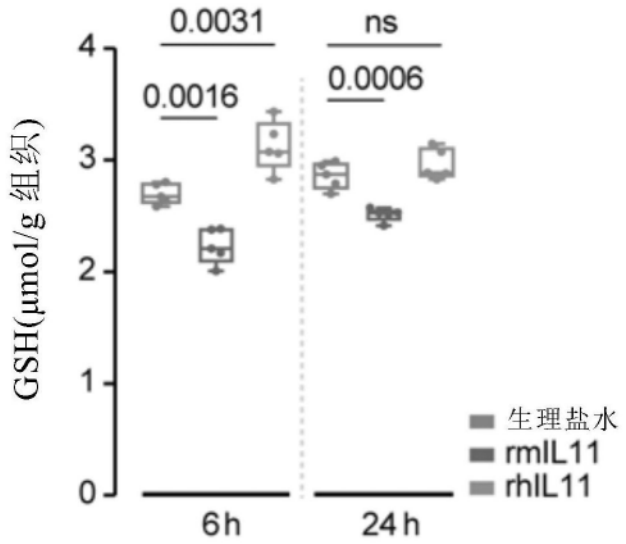

0.0031
ns
0.0016
0.0006
GSH(μmol/g 组织)
4
3
2
1
0
生理盐水
rmIL11
rhIL11
6h
24h

图20D

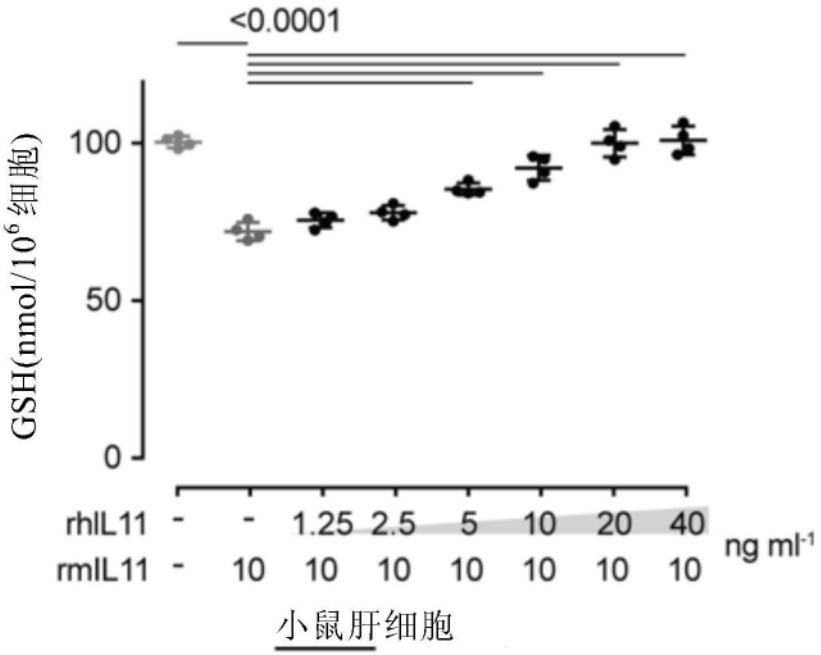

<0.0001
GSH(nmol/10^6 细胞)
100
50
0
rhIL11 - - 1.25 2.5 5 10 20 40 ng ml-1
rmIL11 - 10 10 10 10 10 10 10
小鼠肝细胞

图21A

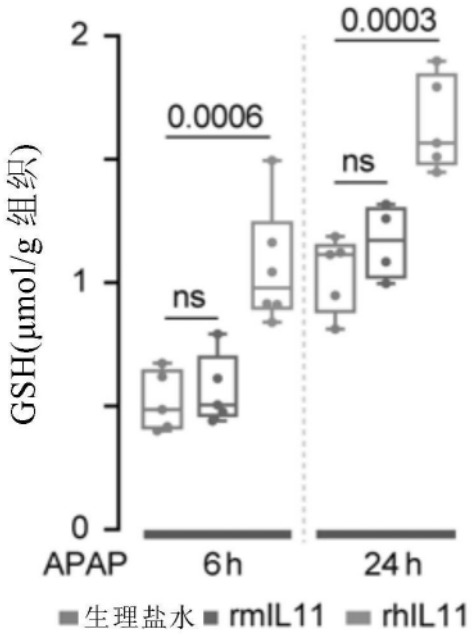

2
1
0
GSH(μmol/g 组织)
0.0006
0.0003
ns
ns
APAP
6h
24h
生理盐水
rmIL11
rhIL11

图21B

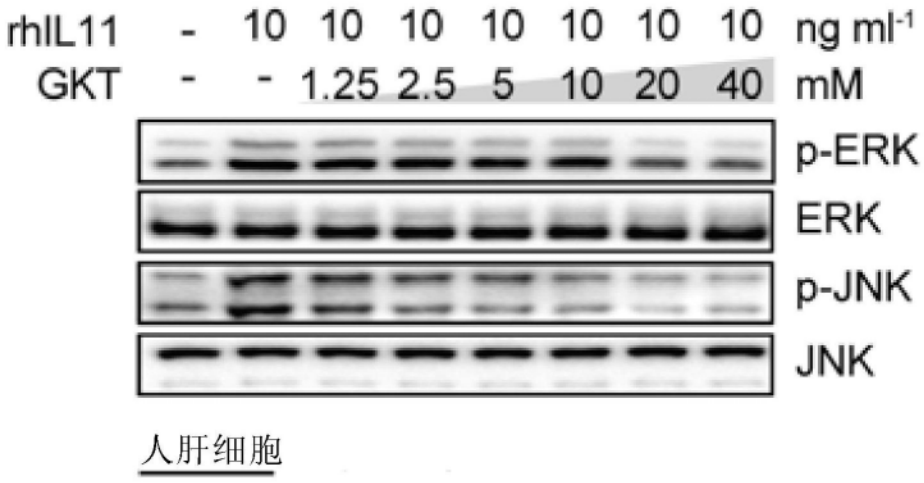

rhIL11 - 10 10 10 10 10 10 10 ng ml-1
GKT - - 1.25 2.5 5 10 20 40 mM
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
人肝细胞

图22A

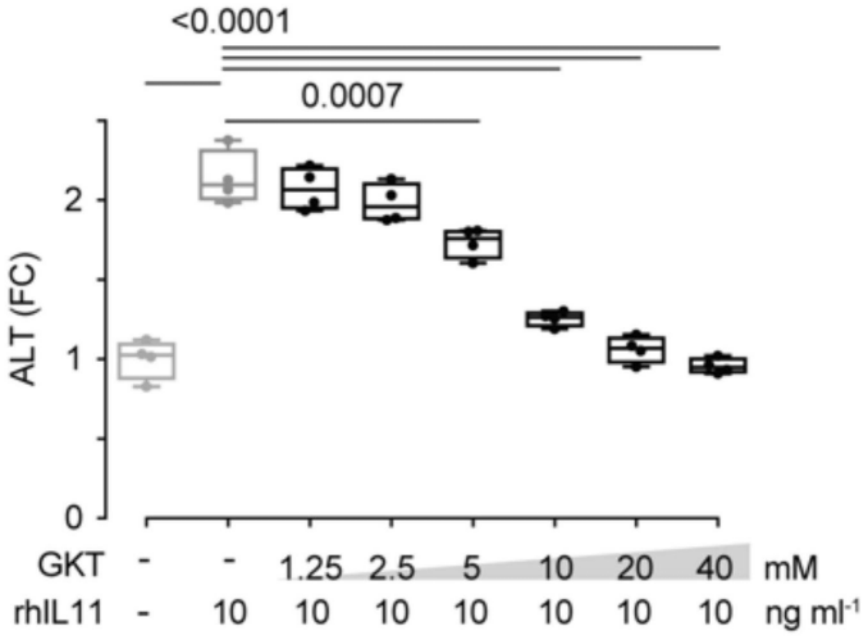

<0.0001
0.0007
ALT (FC)
2
1
0
GKT - - 1.25 2.5 5 10 20 40 mM
rhIL11 - 10 10 10 10 10 10 10 ng ml-1

图22B

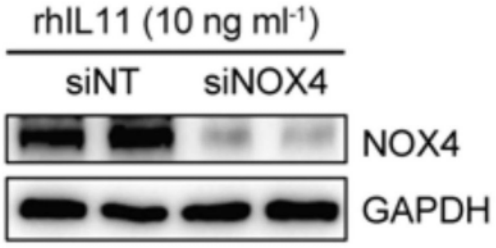

rhIL11 (10 ng ml-1)
siNT
siNOX4
NOX4
GAPDH

图23A

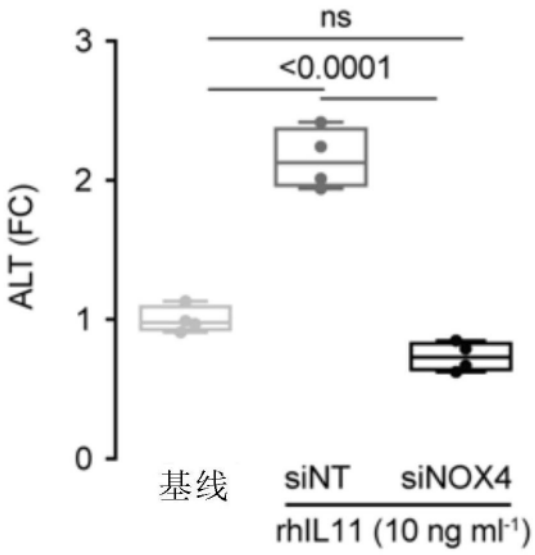


图23B

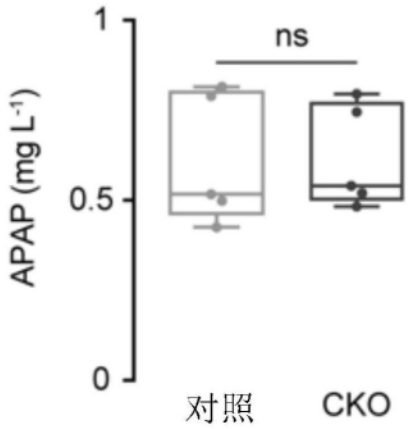


图24A

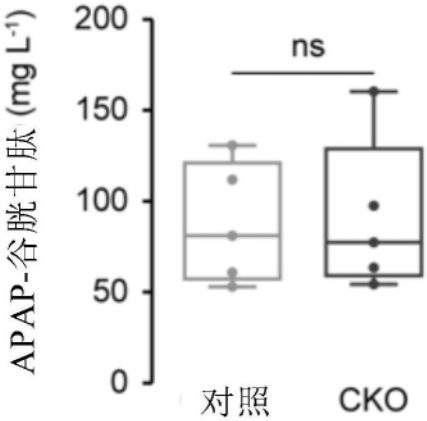


图24B

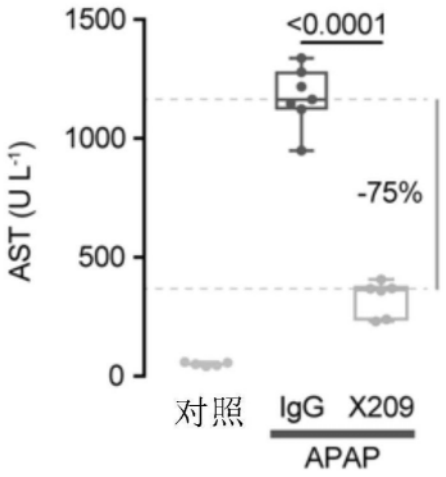

1500
1000
500
0
AST (U L-1)
<0.0001
-75%
对照
IgG
X209
APAP

图25A

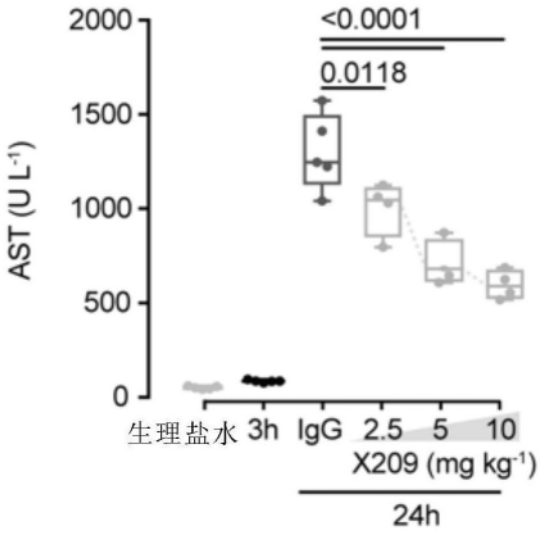

2000
1500
1000
500
0
AST (U L-1)
<0.0001
0.0118
生理盐水
3h
IgG
2.5
5
10
X209 (mg kg-1)
24h

图25B

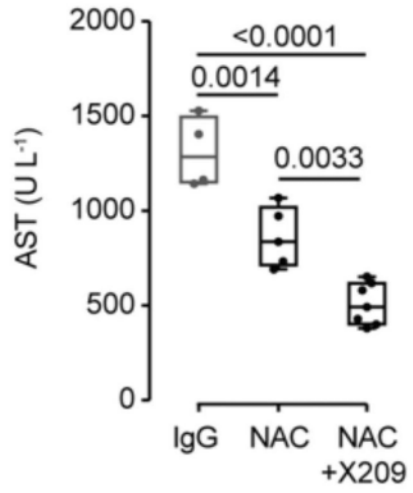

2000
1500
1000
500
0
AST (U L-1)
<0.0001
0.0014
0.0033
IgG
NAC
NAC
+X209

图25C

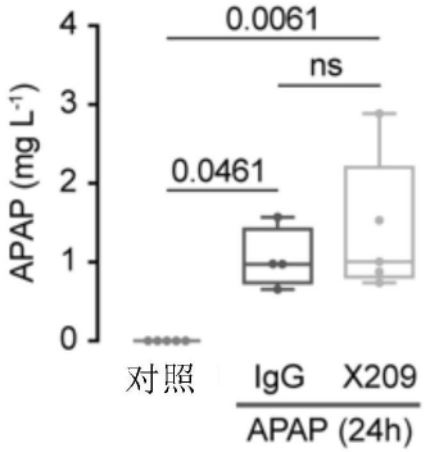

4
3
2
1
0
APAP (mg L-1)
0.0061
ns
0.0461
对照
IgG
X209
APAP (24h)

图26A

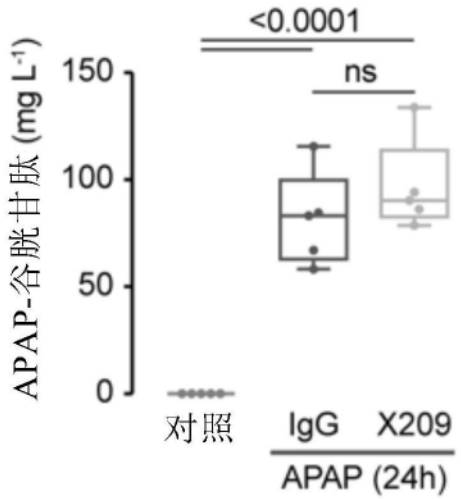

<0.0001
ns
APAP-谷胱甘肽 (mg L-1)
150
100
50
0
对照
IgG
X209
APAP (24h)

图26B

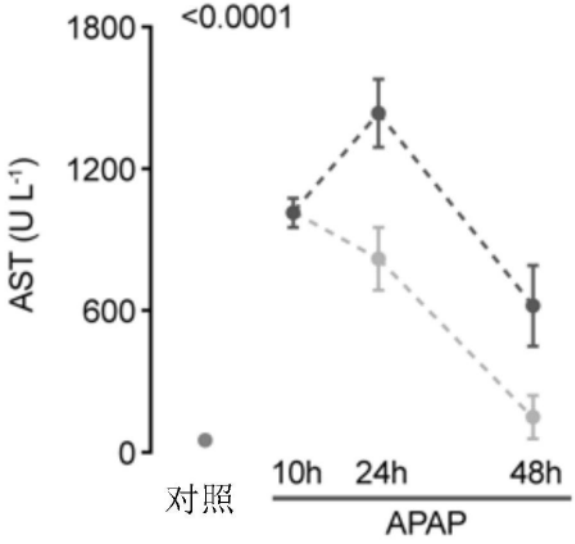

<0.0001
1800
1200
600
0
AST (U L-1)
对照
10h
24h
48h
APAP

图27A

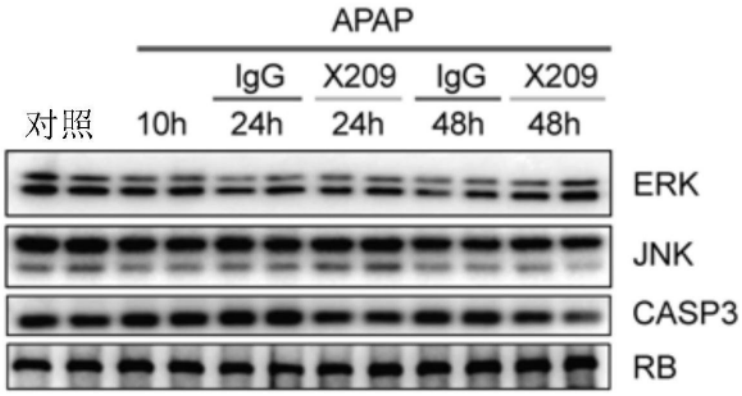


图27B

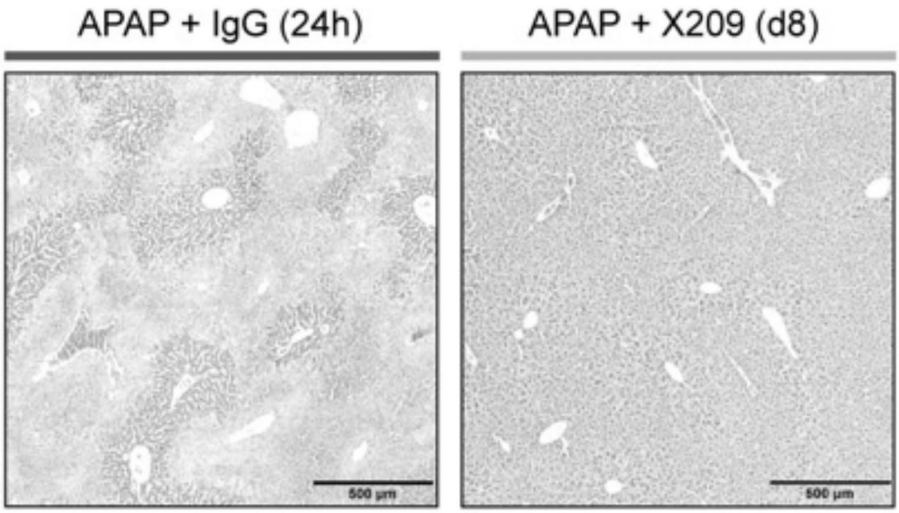


图28A

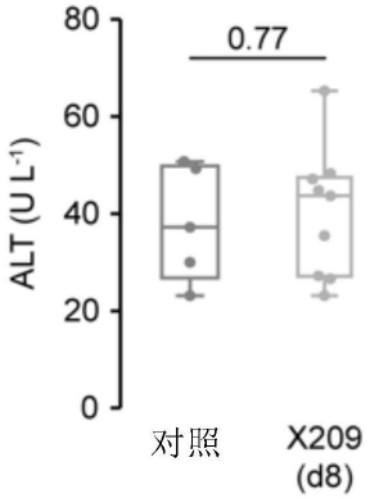


图28B

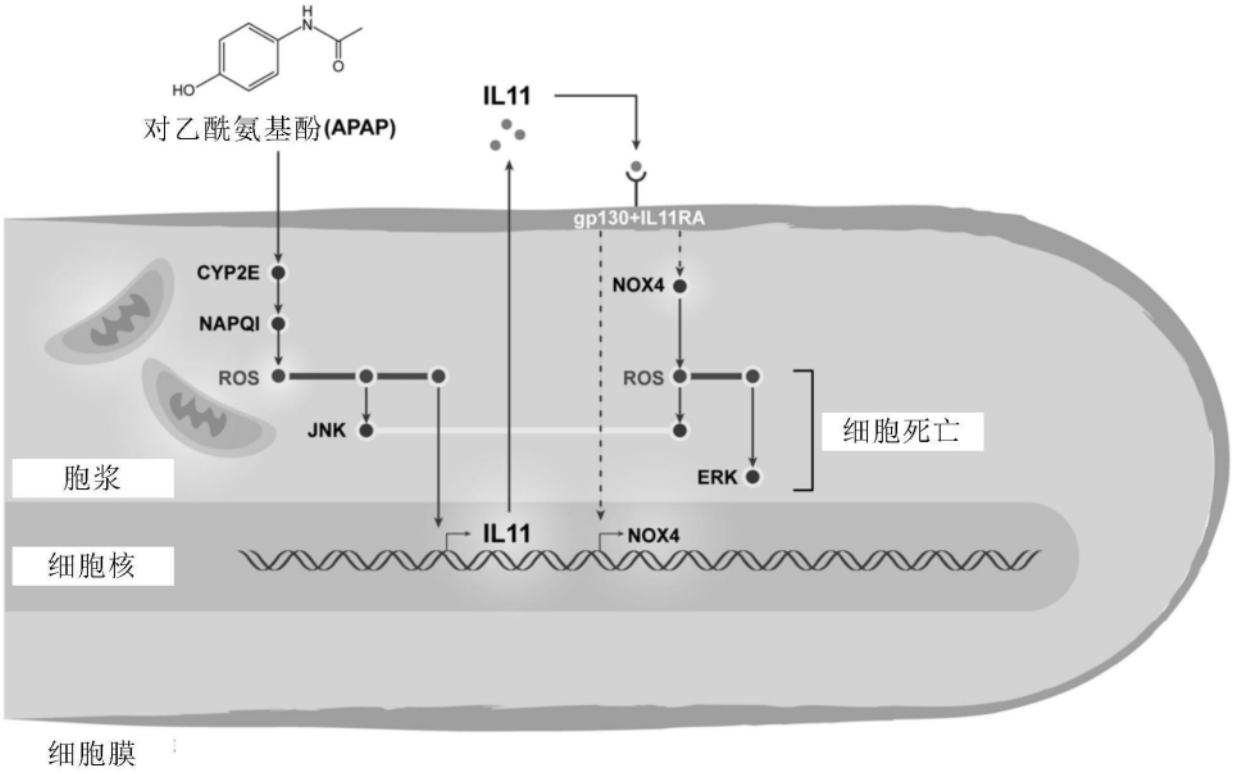
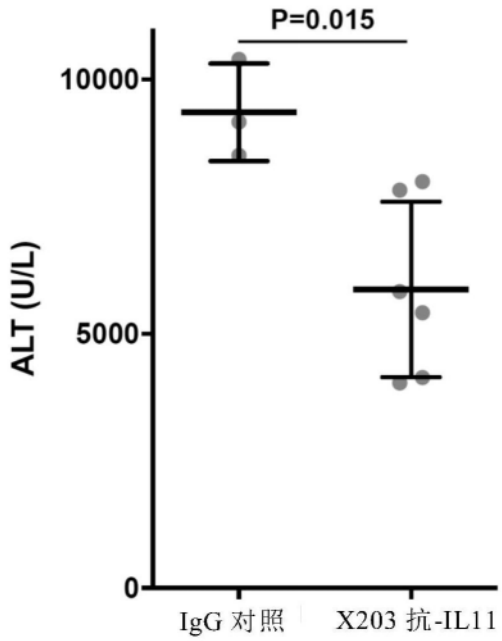
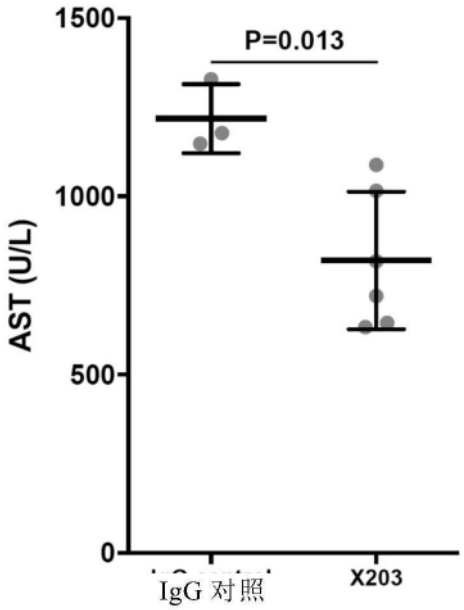


图29



	IgG 对照	X203 抗-IL11
均值	9360	5875
标准差	957.8	1724

图30A



	IgG 对照	X203
均值	1218	820.3
标准差	96.6	192.5

图30B

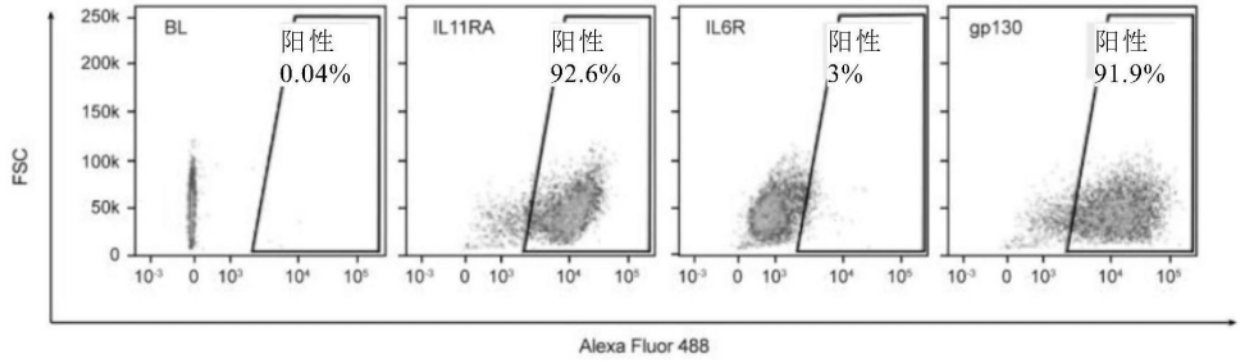


图31A

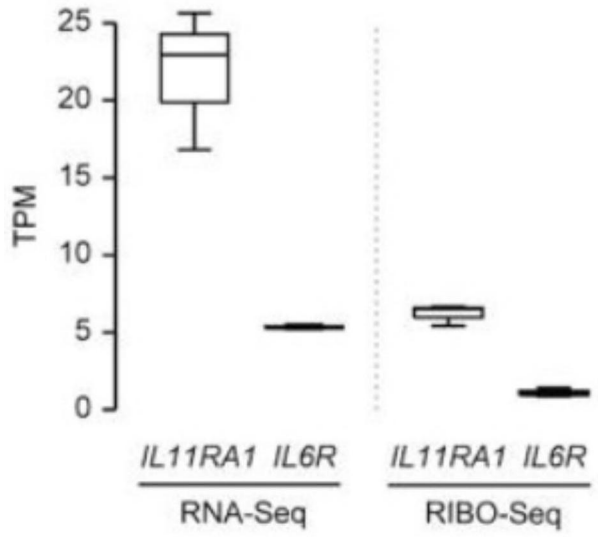

25
20
15
10
5
0
TPM
IL11RA1 IL6R
RNA-Seq
IL11RA1 IL6R
RIBO-Seq

图31B

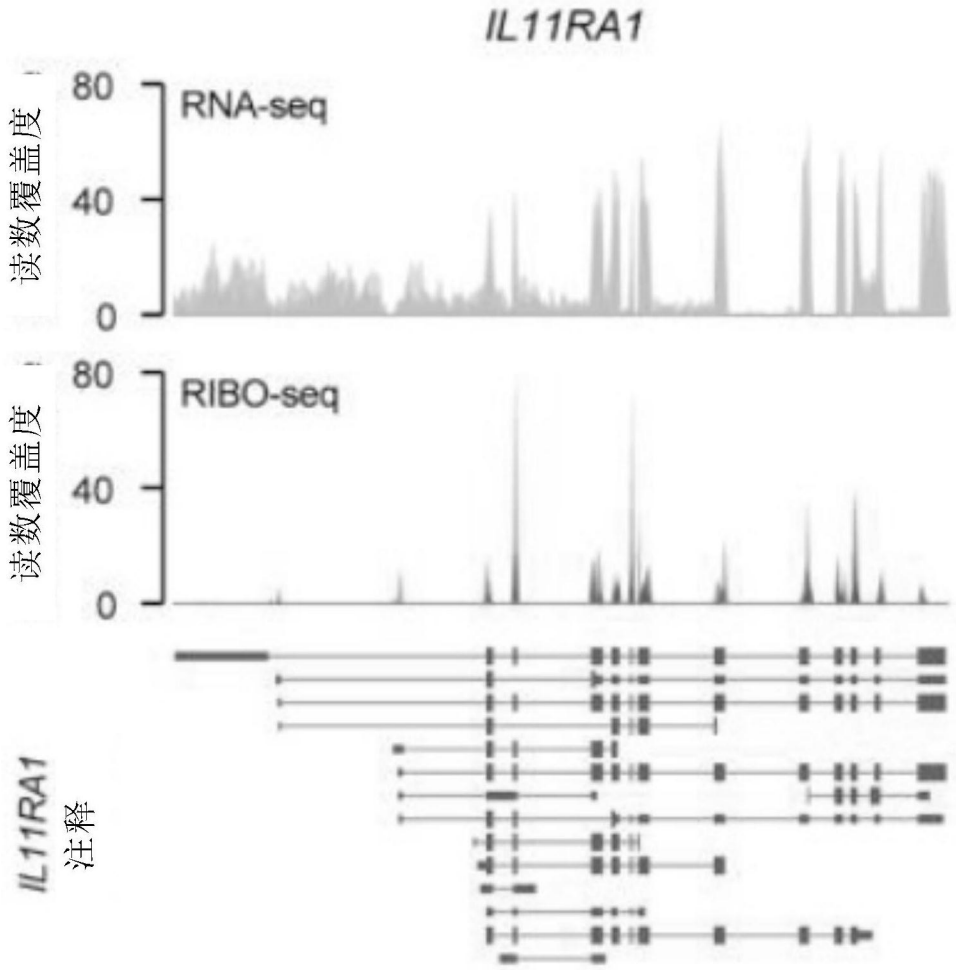

IL11RA1
读数覆盖度
80
40
0
RNA-seq
读数覆盖度
80
40
0
RIBO-seq
IL11RA1
注释

图31C

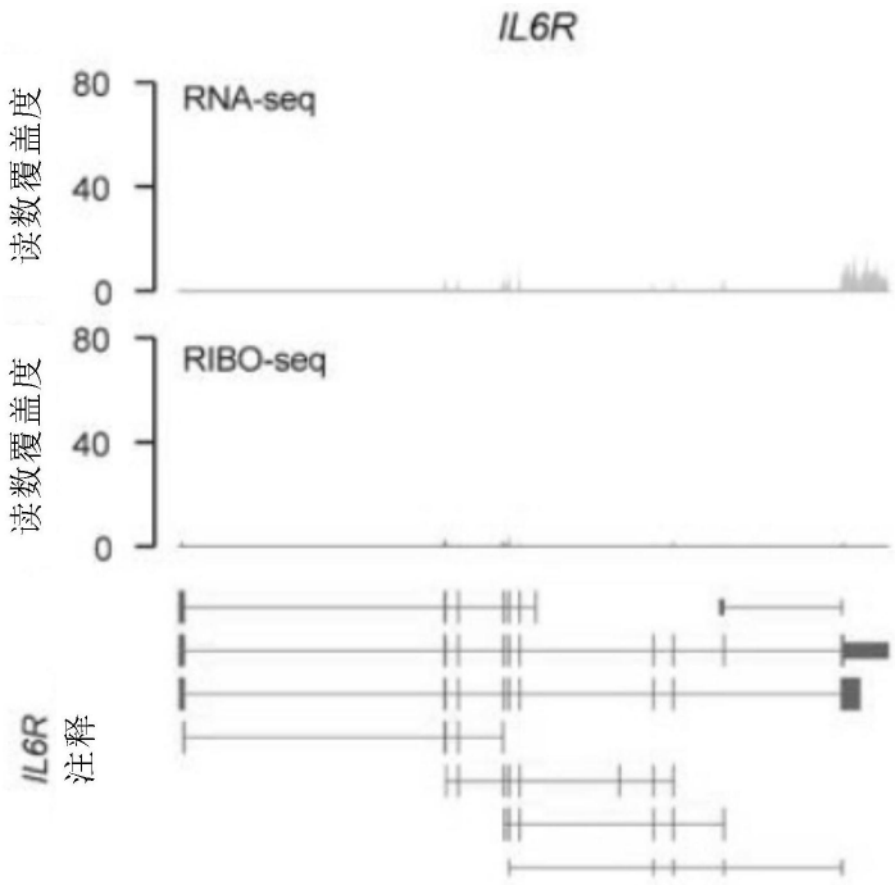


图31D

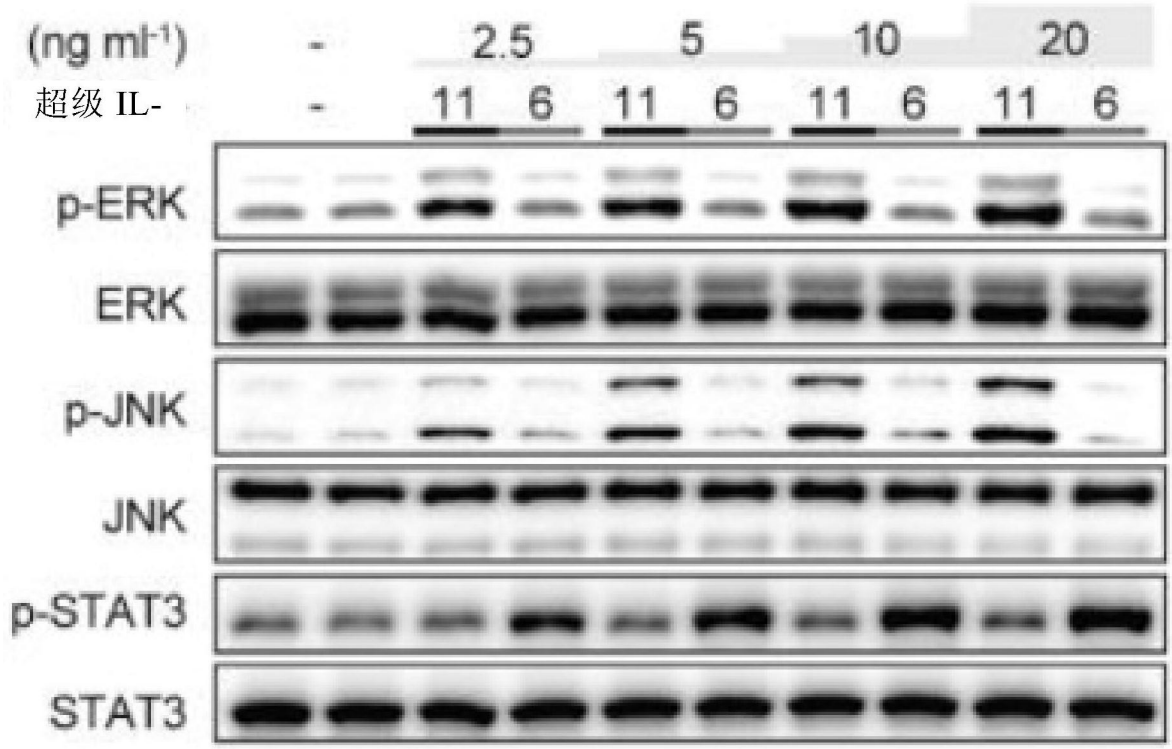

(ng ml-1)
-
2.5
5
10
20
超级 IL-
-
11
6
11
6
11
6
11
6
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-STAT3
STAT3

图31E

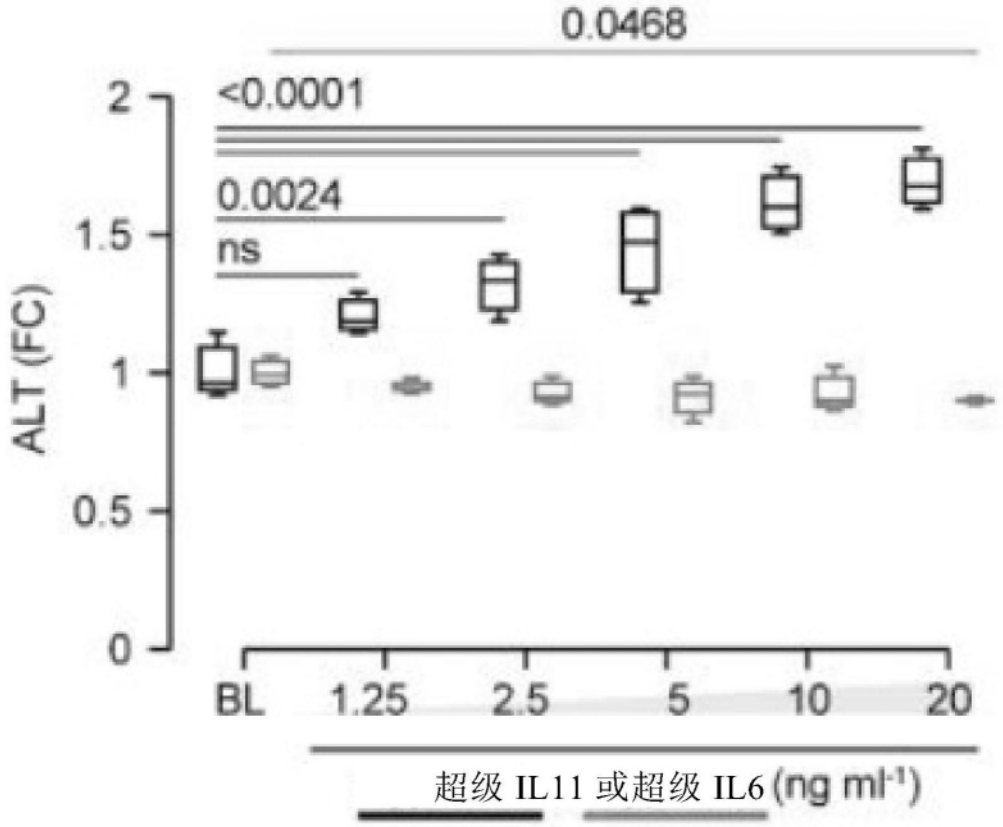

0.0468
<0.0001
0.0024
ns
2
1.5
1
0.5
0
ALT (FC)
BL
1.25
2.5
5
10
20
超级 IL11 或超级 IL6 (ng ml-1)

图31F

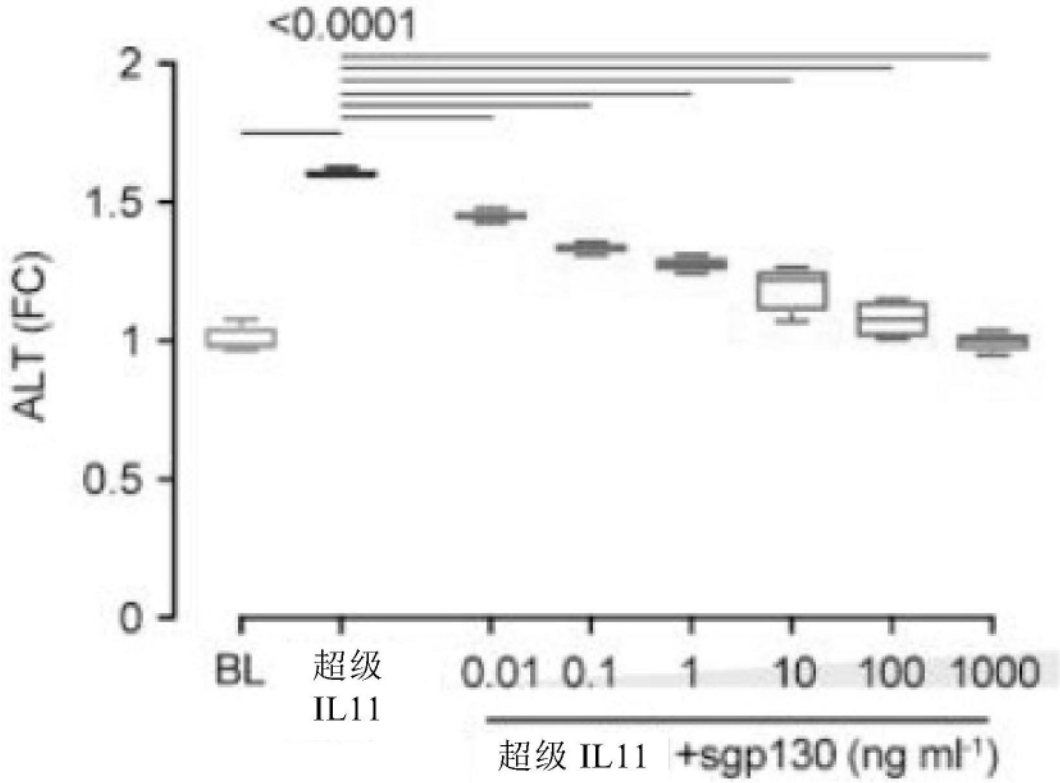

<0.0001
2
1.5
1
0.5
0
ALT (FC)
BL
超级 IL11
0.01 0.1 1 10 100 1000
超级 IL11 +sgp130 (ng ml-1)

图31G

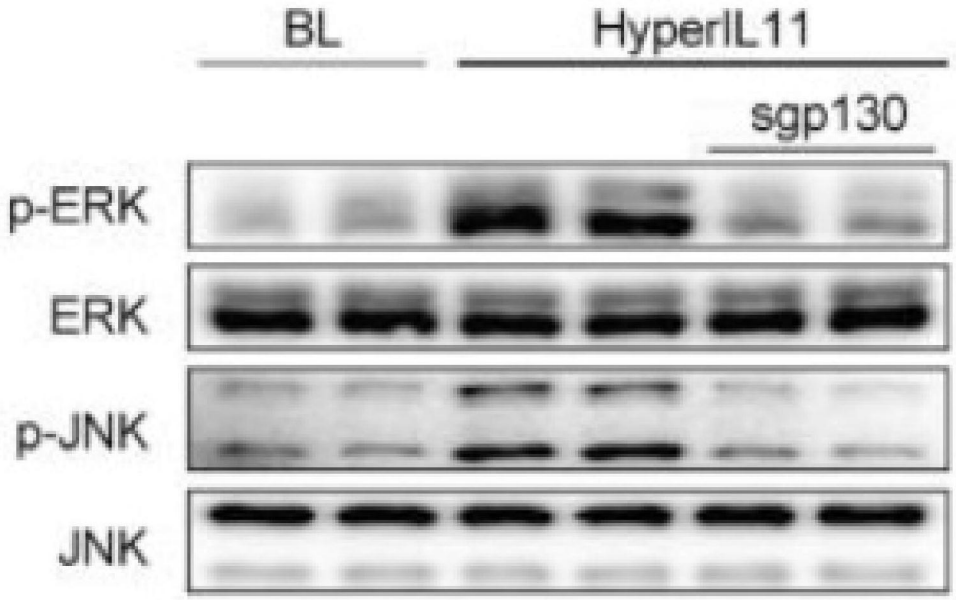

BL
HyperIL11
sgp130
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK

图31H

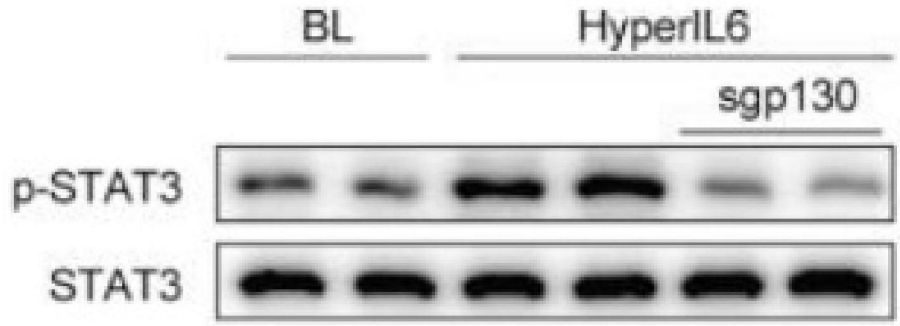

BL
HyperIL6
sgp130
p-STAT3
STAT3

图31I

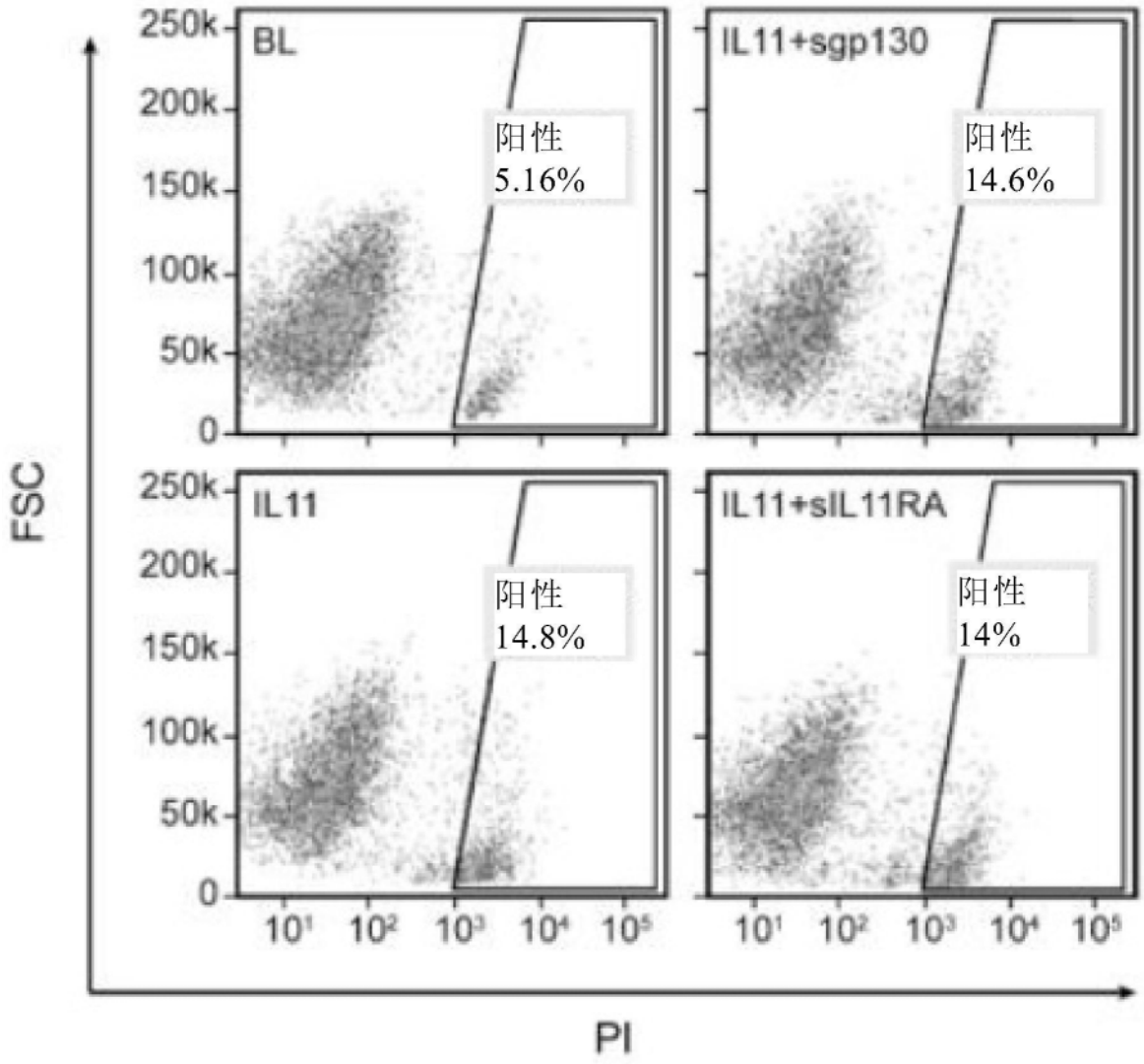

BL
阳性
5.16%
IL11+sgp130
阳性
14.6%
IL11
阳性
14.8%
IL11+sIL11RA
阳性
14%
250k
200k
150k
100k
50k
0
FSC
PI
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵

图31J

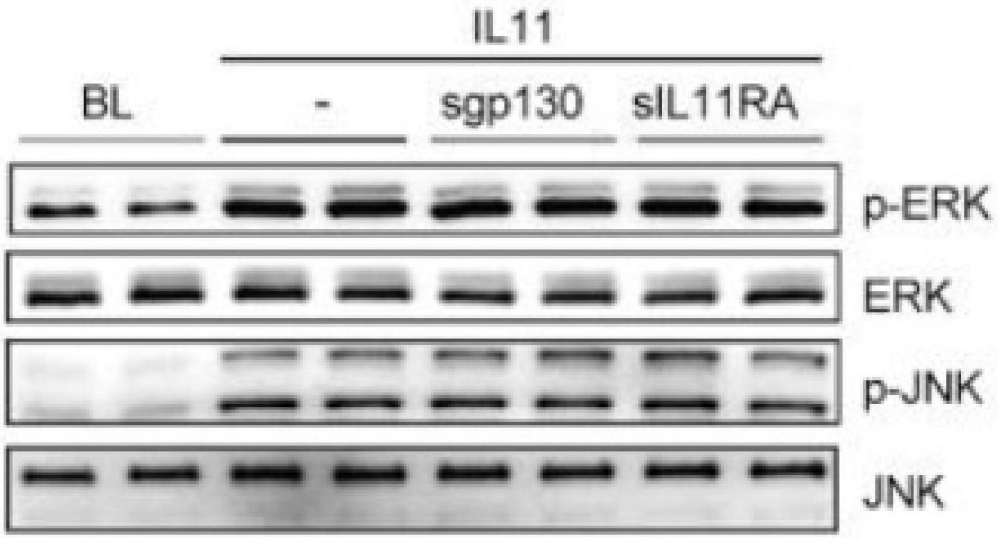

IL11
BL
-
sgp130
sIL11RA
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK

图31K

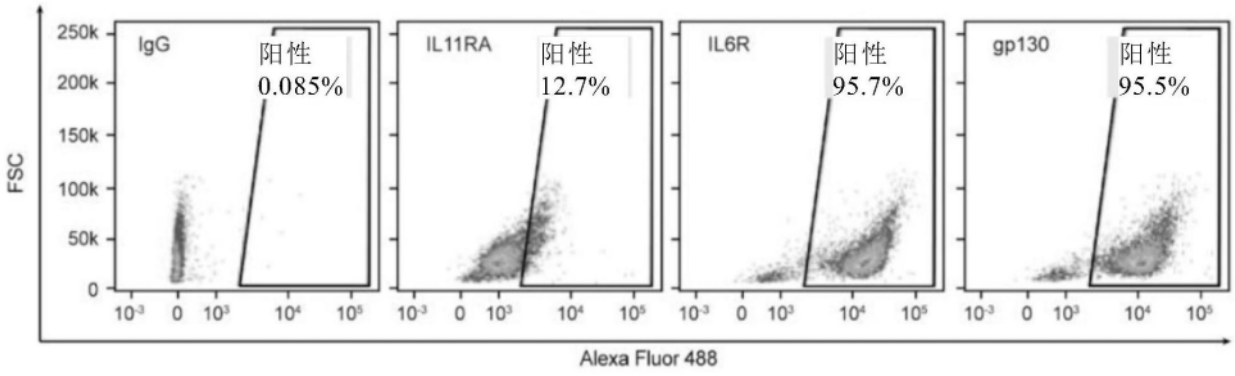

IgG
阳性
0.085%
IL11RA
阳性
12.7%
IL6R
阳性
95.7%
gp130
阳性
95.5%
FSC
Alexa Fluor 488

图32A

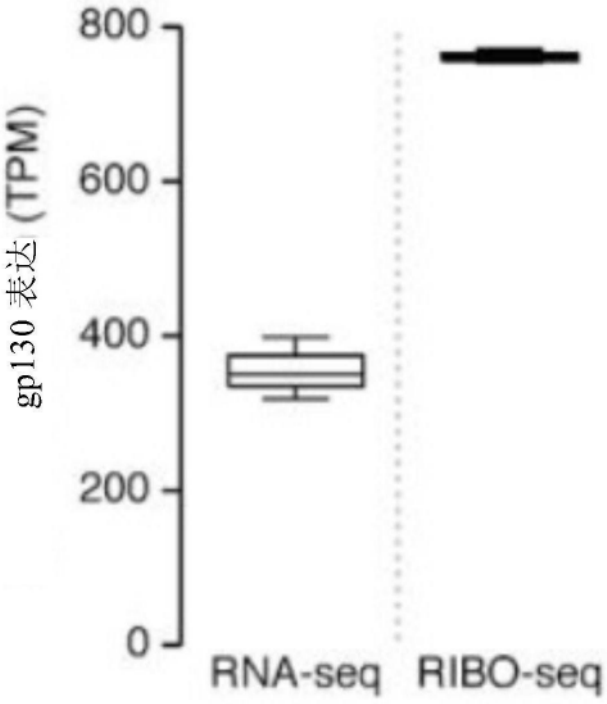

800
600
400
200
0
gp130 表达 (TPM)
RNA-seq
RIBO-seq

图32B

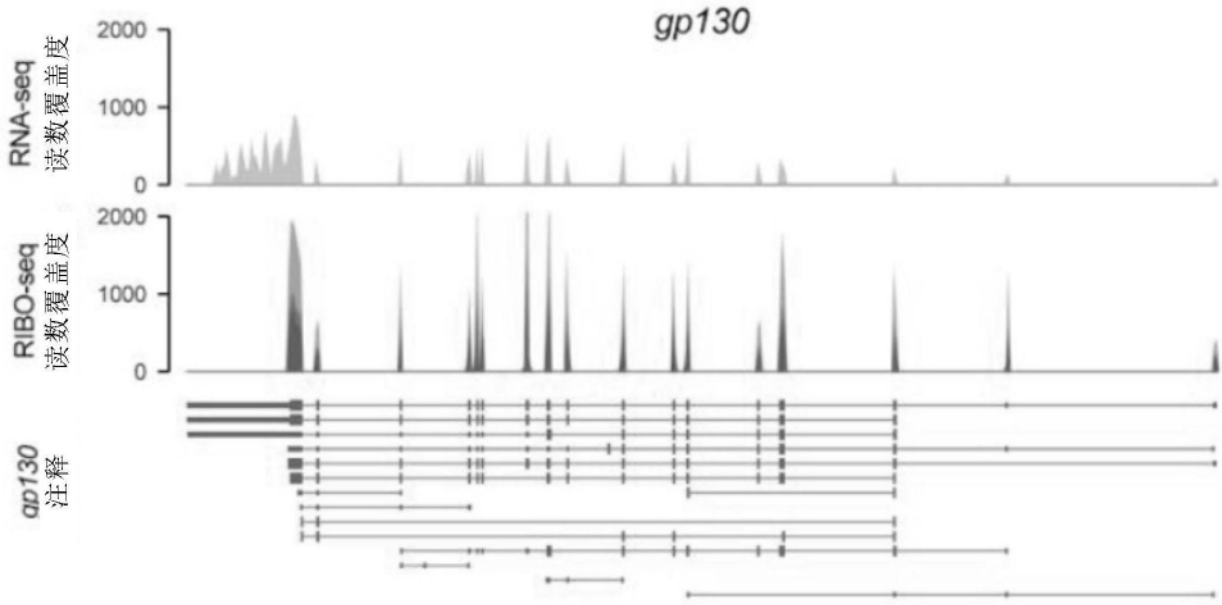

gp130
RNA-seq
读数覆盖度
2000
1000
0
RIBO-seq
读数覆盖度
2000
1000
0
gp130
注释

图32C

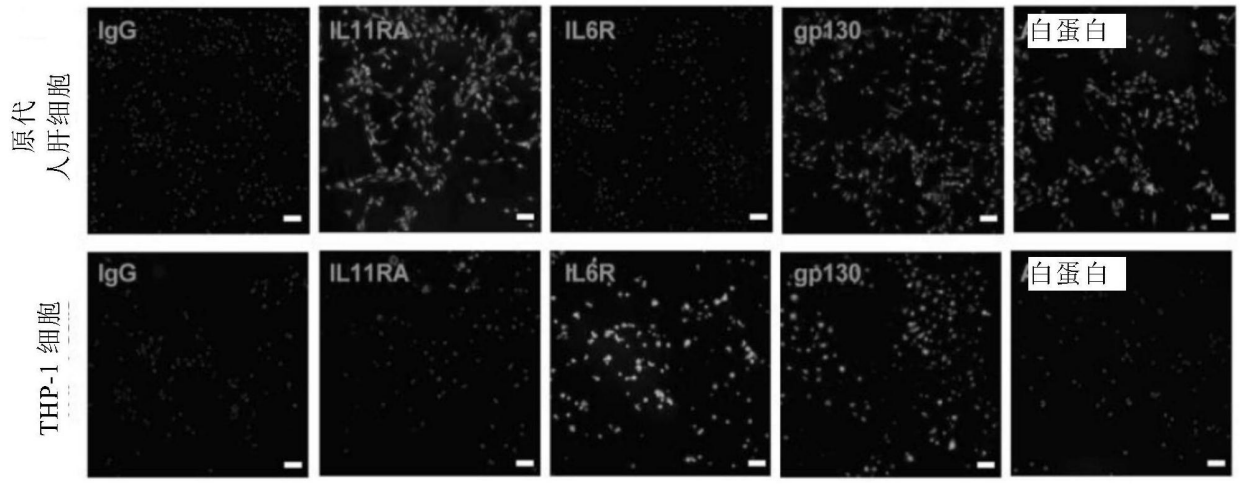

原代
人肝细胞
IgG
IL11RA
IL6R
gp130
白蛋白
THP-1 细胞
IgG
IL11RA
IL6R
gp130
白蛋白

图32D

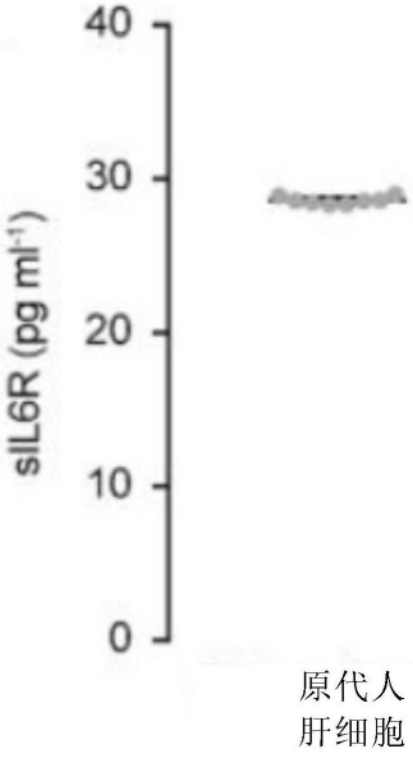

40
30
20
10
0
sIL6R (pg ml⁻¹)
原代人
肝细胞

图32E

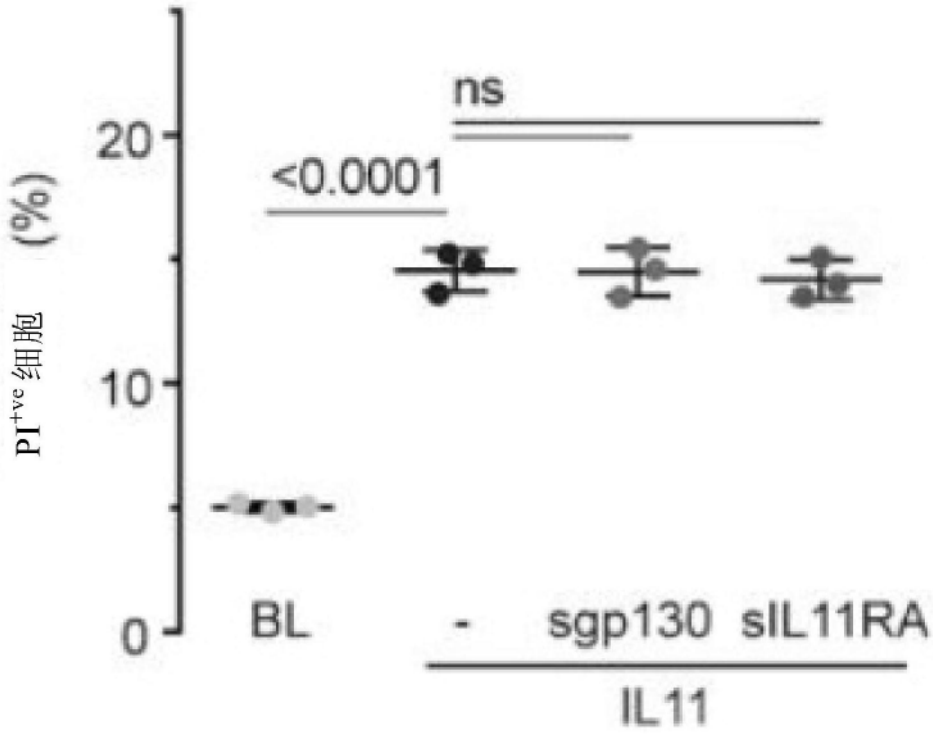

ns
<0.0001
20
10
0
PI+ve细胞 (%)
BL
-
sgp130
sIL11RA
IL11

图32F

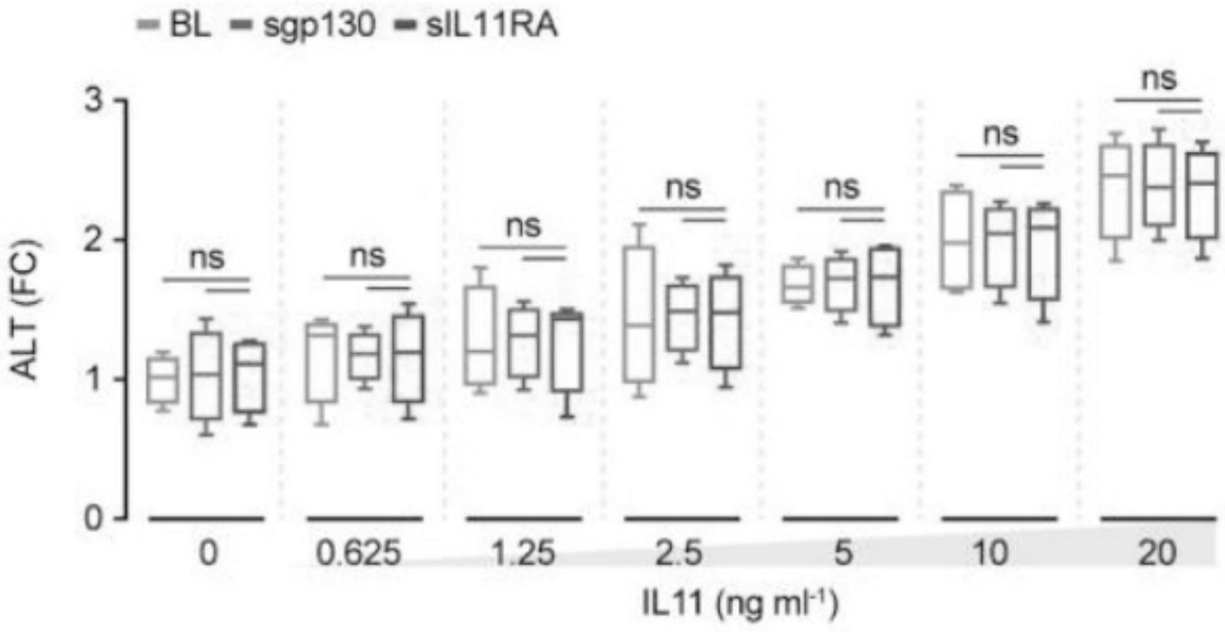

BL
sgp130
sIL11RA
ALT (FC)
3
2
1
0
ns
0
0.625
1.25
2.5
5
10
20
IL11 (ng ml-1)

图32G

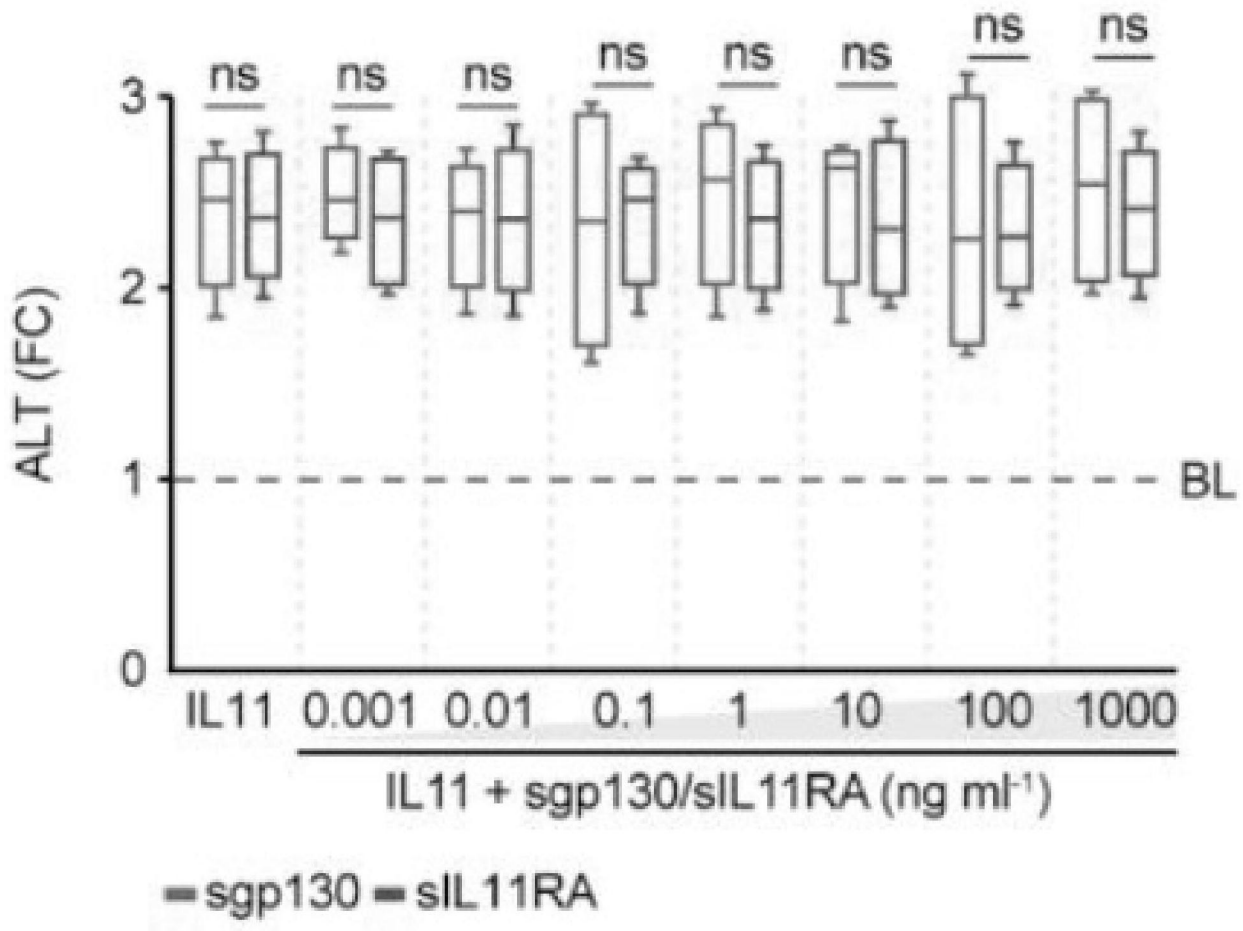

ns
ns
ns
ns
ns
ns
ns
ns
3
2
1
0
ALT (FC)
BL
IL11
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
IL11 + sgp130/sIL11RA (ng ml-1)
sgp130
sIL11RA

图32H