



등록특허 10-2720360



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월22일

(11) 등록번호 10-2720360

(24) 등록일자 2024년10월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/244 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7020275
- (22) 출원일자(국제) 2016년12월16일
 심사청구일자 2021년12월14일
- (85) 번역문제출일자 2018년07월13일
- (65) 공개번호 10-2018-0097645
- (43) 공개일자 2018년08월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/081430
- (87) 국제공개번호 WO 2017/103108
 국제공개일자 2017년06월22일
- (30) 우선권주장
 1522186.4 2015년12월16일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20090202533 A1
 W. Tang et al. The Journal of Clinical Investigation. 1996, vol.98, pp.2845-2853*
 Q. Chen et al. The Journal of Immunology. 2005, vol.174, pp.2305-2313*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 싱가포르 헬스 서비스즈 피티이 엘티디
 싱가포르 싱가포르 168582 아우트랩 커뮤니티 하
 스피톨 하스피탈 블러바드 10 #19-01
 내셔널 유니버시티 오브 싱가포르
 싱가포르 119077 로우어 켄트 리지 로드 21
- (72) 발명자
 쿡, 스튜어트 알렉산더
 싱가포르, 싱가포르 597304, 클레멘티 파크, 선셋
 스퀘어 6
 새퍼, 세바스찬
 싱가포르, 싱가포르 079119, #24-04 센트 76, 센
 트 웨이 76
- (74) 대리인
 안소영

전체 청구항 수 : 총 12 항

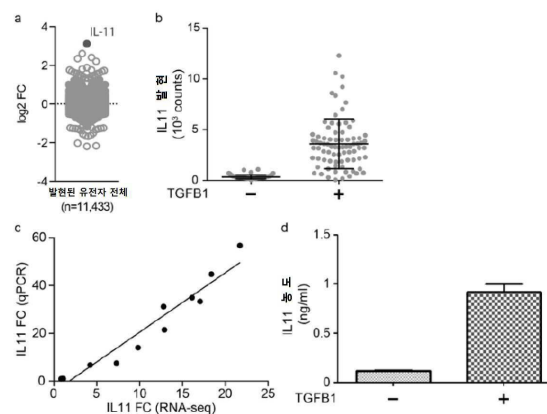
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 **섬유증의 치료**

(57) 요약

인터루킨 11(IL-11)의 작용을 억제할 수 있는 제제의 투여를 통한 대상체의 섬유증 치료, 예방 또는 경감이 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/2866 (2013.01)
C12N 15/1136 (2013.01)
C12N 15/1138 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간에서 섬유증의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물로서,

인터루킨 11(IL-11) 또는 IL-11 수용체 α (IL-11R α)에 대한 결합이 가능하고, IL-11 매개성 신호 전달을 억제할 수 있는 항체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

항체는 IL-11 수용체에 대한 IL-11의 결합을 방지하거나 감소시킬 수 있는 항체인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

항체는 IL-11 결합 항체인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

항체는 IL-11R α 결합 항체인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

섬유증은 심장, 간, 신장 또는 눈의 섬유증인 약학적 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

섬유증은 심장에 있고, 심장의 근육성 또는 전기적 특성의 기능장애, 또는 심장의 벽 또는 판막의 비후(thickening)와 관련이 있는 것인 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

섬유증은 간에 있고, 만성 간 질환 또는 간 경화증(liver cirrhosis)과 관련이 있는 것인 약학적 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

섬유증은 신장에 있고, 만성 신장 질환과 관련이 있는 것인 약학적 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

섬유증은 눈에 있고, 망막 섬유증, 망막마갈 섬유증, 또는 망막하 섬유증인 약학적 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,

약학적 조성물은 IL-11 또는 IL-11R 발현이 상향 조절되는 대상체에 투여되는 것인 약학적 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서,

약학적 조성물은 IL-11 또는 IL-11R 발현이 상향 조절되는 것으로 결정된 대상체에 투여되는 것인 약학적 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서,

약학적 조성물은 IL-11 또는 IL-11R의 발현이 대상체에서 상향 조절되는지를 결정한 후 IL-11 또는 IL-11R 발현이 상향 조절되는 대상체에 투여되는 것인 약학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 섬유증(fibrosis)의 진단 및 치료에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 섬유 형성은 상처 치유의 중요한 부분인 필수적 과정이다. 과도한 섬유 형성은 많은 희귀한 질병 상태와 흔한 질병 상태에서 공통적이며, 질병의 발병 기전에서 중요하다. 과도한 섬유 형성을 특징으로 하는 질병에는 전신 경화증(systemic sclerosis), 피부 경화증(scleroderma), 비후성 심근병증(hypertrophic cardiomyopathy), 확장 심근병증(dilated cardiomyopathy, DCM), 심방세동(atrial fibrillation), 심실세동(ventricular fibrillation), 심장 근육염(myocarditis), 간 경화증(liver cirrhosis), 신장 질환(kidney disease), 눈 질환(disease of the eye), 천식(asthma), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 관절염(arthritis) 및 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis)이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 인체 건강에 큰 영향을 미침에도 불구하고, 섬유증에 대한 치료적 접근법 및 진단적 접근법은 여전히 충족되지 않은 의학적인 요구에 해당한다.

[0003] 인터루킨 11(IL-11)의 실제 생리학적 역할은 여전히 불분명하다. IL-11은 조혈세포(haematopoietic cell)의 활성화 및 혈소판 생성과 가장 밀접하게 관련되어 있지만, 전염증성(pro-inflammatory)뿐만 아니라 항염증성(anti-inflammatory), 혈관신생 촉진성(pro-angiogenic)인 것으로 밝혀졌고, 종양 형성(neoplasia)에 중요한 것으로 나타났다. TGFβ1 또는 조직 손상이 IL-11 발현을 유도할 수 있음이 알려져 있다(Zhu, M. et al. IL-11

Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. PLOS ONE 10, (2015); Yashiro, R. et al. Transforming growth factor-beta stimulates interleukin-11 production by human periodontal ligament and gingival fibroblasts. J. Clin. Periodontol. 33, 165-71 (2006); Obana, M. et al. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. Circulation 121, 684-91 (2010); Tang, W., Yang, L., Yang, Y. C., Leng, S. X. & Elias, J. A. Transforming growth factor-beta stimulates interleukin-11 transcription via complex activating protein-1-dependent pathways. J. Biol. Chem. 273, 5506-13 (1998)).

[0004] 섬유증에서의 IL-11의 역할은 공개된 문헌으로부터 분명하지 않다. IL-11은 섬유증 및 폐의 염증에 중요하다고 생각되며(Tang, W. et al. Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction. J. Clin. Invest. 98, 2845-53 (1996)), 그것의 발현 수준은 피부의 콜라겐 수준(Toda, M. et al. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. Journal of Allergy and Clinical Immunology 111, 875-881 (2003)) 및 호흡계의 콜라겐 수준(Molet, S., Hamid, Q. & Hamilos, D. IL-11 and IL-17 expression in nasal polyps: Relationship to collagen deposition and suppression by intranasal fluticasone propionate. The Laryngoscope 113, (2003); Minshall et al. IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. The Journal of allergy and clinical immunology 105, (2000))과 관련이 있다.

[0005] 그러나, 연구의 대부분은 IL-11이 심장에서 항섬유화성(anti-fibrotic)이고((Obana, M. et al. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. Circulation 121, 684-91 (2010); Obana, M. et al. Therapeutic administration of IL-11 exhibits the postconditioning effects against ischemia-reperfusion injury via STAT3 in the heart. American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology 303, H569-77 (2012)) 및 신장(Stangou, M. et al. Effect of IL-11 on glomerular expression of TGF-beta and extracellular matrix in nephrotoxic nephritis in Wistar Kyoto rats. Journal of nephrology 24, 106-11 (2011); Ham, A. et al. Critical role of interleukin-11 in isoflurane-mediated protection against ischemic acute kidney injury in mice. Anesthesiology 119, 1389-401 (2013)), 몇몇 조직 및 만성 염증성 질환에서 항염증성(Trepicchio & Dorner. The therapeutic utility of Interleukin-11 in the treatment of inflammatory disease. (1998). doi:10.1517/13543784.7.9.1501)임을 시사한다. 일반적으로, IL-11의 분자적 작용 양식은 STAT3-매개성 전사를 통한 mRNA 수준의 RNA 발현의 조절이라고 생각된다(Zhu, M. et al. IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. PLOS ONE 10, (2015)).

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0006] 발명의 요약

[0007] 본 발명의 일 양태는 인터루킨 11(IL-11)의 작용을 억제할 수 있는 제제(agent)의 투여를 통한, 치료가 필요한 대상체의 섬유증의 치료, 예방 또는 경감에 관한 것이다. 본 발명자들은 IL-11이 섬유증 촉진(pro-fibrotic) 작용을 나타냄을 확인하였다. 본 발명은 특히 IL-11의 섬유증 촉진 작용을 억제하는 것과 관련이 있다. 본 발명의 구현예는 예를 들어, IL-11의 IL-11 수용체에 대한 결합에 의해 매개되는, IL-11 매개성 섬유화 촉진 신호(pro-fibrotic signal)의 억제 또는 방지에 관한 것이다.

[0008] 일부 구현예에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제는 IL-11 수용체에 대한 IL-11의 결합을 예방하거나 감소시킬 수 있다.

[0009] 일부 구현예에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제는 IL-11과 결합하여 제제 및 IL-11을 포함하는 복합체를 형성할 수 있다. 복합체는 비-공유적 또는 공유적 복합체일 수 있다. 일부 구현예에서, 제제:IL-11 복합체의 형성은 IL-11 수용체에 대해 결합하는 IL-11의 능력을 방지하거나 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 방지 또는 감소는 IL-11 수용체에 대한 IL-11의 생산적 결합(productive binding)의 감소, 즉, IL-11 수용체 매개성 신호전달을 개시하는 IL-11의 능력의 감소의 결과일 수 있다. 일부 구현예에서, 제제:IL-11 복합체의 형성

은 IL-11 수용체로부터 IL-11을 격리시켜, IL-11 수용체와 IL-11의 접촉을 방지하거나 감소시키고, 및/또는 IL-11 수용체에 결합 가능한 IL-11의 양을 방지하거나 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 제제는 유인 수용체(decoy receptor)일 수 있다.

- [0010] 일부 구현예에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제는 IL-11 수용체에 결합할 수 있다. IL-11 수용체와 결합하는 제제는 IL-11 수용체(IL-11R)에 결합하는 IL-11의 능력을 방해하거나 감소시킬 수 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 양태는 IL-11 또는 IL-11 수용체(IL-11R)의 발현을 방지할 수 있거나 감소시킬 수 있는 제제의 투여를 통한, 치료가 필요한 대상체의 섬유증의 치료, 예방 또는 경감에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 일 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 인터루킨 11(IL-11)의 작용을 억제할 수 있는 제제가 제공된다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제의 용도가 제공된다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법으로서, 치료학적 유효량의 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제를 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0015] 일부 구현예에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제는 IL-11 수용체에 대한 IL-11의 결합을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제이다.
- [0016] 일부 구현예에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제는 IL-11 결합제이다. IL-11 결합제(binding agent)는 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 압타머 또는 소분자로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, IL-11 결합제는 항체이다. 일부 구현예에서, IL-11 결합제는 유인 수용체이다.
- [0017] 일부 구현예에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제는 IL-11 수용체(IL-11R) 결합제이다. IL-11R 결합제는 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 압타머 또는 소분자로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, IL-11R 결합제는 항체이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한, IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제가 제공된다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서, IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제의 용도가 제공된다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법으로서, 치료학적 유효량의 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0021] 일부 구현예에서, IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제는 소분자 또는 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0022] 일부 구현예에서, 치료되거나 예방되는 섬유증은 심장, 간 또는 신장의 섬유증이다. 일부 구현예에서, 치료되거나 예방되는 섬유증은 눈의 섬유증이다. 일부 구현예에서, 섬유증은 심장의 섬유증이고, 심장의 근육성 또는 전기적 특성의 기능장애, 또는 심장의 벽 또는 판막의 비후(thickening)와 관련이 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 간의 섬유증이고, 만성 간 질환 또는 간 경화증(liver cirrhosis)과 관련이 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 신장의 섬유증이고, 만성 신장 질환과 관련이 있다.
- [0023] 일부 구현예에서, 치료 또는 예방 방법은 상기 제제를 IL-11 또는 IL-11R 발현이 상향 조절된 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료 또는 예방 방법은 상기 제제를 IL-11 또는 IL-11R 발현이 상향 조절된 것으로 결정된 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료 또는 예방 방법은 IL-11 또는 IL-11R 발현이 대상체에서 상향 조절되는지를 결정하는 단계 및 상기 제제를 IL-11 또는 IL-11R 발현이 상향 조절되는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 양태에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제를 이용한 섬유증의 치료 또는 예방에 대한 대상체의 적합성(suitability)을 결정하는 방법으로서, IL-11 또는 IL-11R 발현이 대상체에서 상향 조절되는지를 선택적으로 시험관 내(in vitro)에서 결정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제를 이용한 섬유증의 치료 또는 예방을 위한 대상체를 선택하는 방법으로서, IL-11 또는 IL-11R 발현이 대상체에서 상향 조절되는지를, 선택적으로 시험관

내에서, 결정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

- [0026] 본 발명의 또 다른 양태에서, 대상체의 섬유증 또는 섬유증 발병 위험을 진단하는 방법으로서, 대상체로부터 수득된 샘플에서의 IL-11 또는 IL-11R의 상향 조절을, 선택적으로 시험관 내에서, 결정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0027] 일부 구현예에서, 방법은 섬유증을 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체에서 섬유증의 진단을 확인하는 방법이다.
- [0028] 일부 구현예에서, 방법은 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 치료를 위한 대상체를 선택하는 단계를 더 포함한다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증을 앓고 있거나 섬유증을 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체에 대한 예후를 제공하는 방법으로서, 대상체로부터 수득된 샘플에서 IL-11 또는 IL-11R이 상향 조절되는지를, 선택적으로 시험관 내에서, 결정하는 단계 및 그 결정에 기초하여 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 대상체의 치료에 대한 예후를 제공하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0030] 방법은 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용하여 치료하기 위한 IL-11 또는 IL-11R이 상향 조절된 것으로 결정된 대상체를 선택하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 양태에서, 대상체의 섬유증 또는 섬유증 발병 위험을 진단하는 방법으로서, IL-11 또는 IL-11R 발현의 상향 조절을 예측하거나 IL-11 또는 IL-11R 활성의 상향 조절을 예측하는 대상체에서 하나 이상의 유전적 요인을, 선택적으로 시험관 내에서, 결정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0032] 일부 구현예에서, 방법은 섬유증을 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체에서 섬유증 진단을 확정하는 방법이다.
- [0033] 일부 구현예에서, 방법은 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용하여 치료하기 위한 대상체를 선택하는 단계를 더 포함한다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증을 앓고 있거나 섬유증을 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체에 대한 예후를 제공하는 방법으로서, IL-11 또는 IL-11R 발현의 상향 조절을 예측하거나 IL-11 또는 IL-11R 활성의 상향 조절을 예측하는 대상체의 하나 이상의 유전적 요인을, 선택적으로 시험관 내에서, 결정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에서, 인간 대상체에서 섬유증을 치료하는 방법으로서, 치료학적 유효량의 항-인터루킨 11(IL-11) 항체를 치료가 필요한 인간 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 항-IL-11 항체는 IL-11에 결합하여 IL-11 매개성 신호전달을 억제하는 방법이 제공된다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 양태에서, 대상체의 섬유증을 치료하는 방법으로서,
- [0037] (i) IL-11 또는 인터루킨 11 수용체(IL-11R)의 발현이 대상체에서 상향 조절되는지를, 선택적으로 시험관 내에서, 결정하는 단계; 및
- [0038] (ii) 치료학적 유효량의 항-IL-11 항체를 IL-11 또는 IL-11R 발현이 상향 조절된 대상체에 투여하는 단계
- [0039] 를 포함하며, 여기에서 항-IL-11 항체는 IL-11에 결합하여 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 방법이 제공된다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에서, 대상체의 섬유증을 치료하는 방법으로서,
- [0041] (i) 인터루킨 11(IL-11) 또는 인터루킨 11 수용체(IL-11R)의 발현 또는 활성의 상향 조절을 예측하는 대상체의 하나 이상의 유전적 요인을, 선택적으로 시험관 내에서, 결정하는 단계;
- [0042] (ii) (i)의 결정에 기초하여 치료를 위한 대상체를 선택하는 단계; 및
- [0043] (iii) 치료학적 유효량의 항-IL-11 항체를 선택된 대상체에 투여하는 단계
- [0044] 를 포함하며, 항-IL-11 항체는 IL-11에 결합하여 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 방법이 제공된다.
- [0045] **설명**
- [0046] IL-11 및 IL-11 수용체

- [0047] 지방 생성 억제 인자(adipogenesis inhibitory factor)로도 알려져 있는 인터루킨 11(IL-11)은 다면 발현성(pleiotropic) 사이토카인이자 IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, 온코스타틴(oncostatin), 백혈병 억제 인자(leukemia inhibitory factor, LIF), 카디오토프린-1(cardiotrophin-1, CT-1), 카디오토프린 유사 사이토카인(cardiotrophin-like cytokine, CLC), 섬모 신경영양 인자(ciliary neurotrophic factor, CNTF) 및 뉴로포이에틴(neuropoietin, NP-1)을 포함하는 사이토카인의 IL-6 패밀리를 구성원이다.
- [0048] IL-11은 세포로부터의 효율적인 분비를 보장하는 전형적(canonical) 신호 펩타이드로 전사된다. 미성숙한 형태의 인간 IL-11은 199개 아미노산의 폴리펩타이드인 반면, 성숙한 형태의 IL-11은 178개 아미노산 잔기의 단백질을 암호화한다(Garbers and Scheller., Biol. Chem. 2013; 394(9):1145-1161). 인간 IL-11 아미노산 서열은 UniProt 등록번호 P20809(P20809.1 GI:124294) 하에 이용 가능하다. 재조합 인간 IL-11(오프레벨린)도 상업적으로 이용 가능하다. 마우스, 랫트, 돼지, 소, 몇몇 종의 경골어류(bony fish) 및 영장류를 포함하는 기타 종으로부터의 IL-11 또한 클로닝되고 서열 분석되었다.
- [0049] 본 명세서에서, IL-11은 임의의 종으로부터의 IL-11을 지칭하고, 임의의 종으로부터의 IL-11의 아이소형, 단편, 변이체 또는 동족체를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 종은 인간(호모 사피엔스)이다. IL-11의 아이소형, 단편, 변이체 또는 동족체는 선택적으로 주어진 종, 예를 들어 인간으로부터의 미성숙 또는 성숙 IL-11의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. IL-11의 아이소형, 단편, 변이체 또는 동족체는 선택적으로 (바람직하게는, 동일한 종으로부터의) IL-11R α 에 결합하고, IL-11R α 및 gp130을 발현하는 세포에서 신호 전달을 자극하는 능력을 특징으로 할 수 있다(예를 들어, 문헌[Curtis et al. Blood, 1997, 90(11)]; 또는 문헌[Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80]에 기술된 바와 같다). IL-11의 단편은 (아미노산의 수에 따른) 임의의 길이일 수 있지만, 선택적으로 성숙 IL-11의 길이의 적어도 25%일 수 있고, 성숙 IL-11의 길이의 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 하나의 최대 길이를 가질 수 있다. IL-11의 단편은 10개 아미노산의 최소 길이 및 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 195개 아미노산 중 하나의 최대 길이를 가질 수 있다.
- [0050] IL-11은 세포 전역에서(ubiquitously) 발현되는 β -수용체 당단백질 130(gp130; 당단백질 130, IL6ST, IL6-베타 또는 CD130으로도 알려져 있음)의 호모다이머(homodimer)를 통해 신호를 보낸다. gp130은 IL-6 수용체 패밀리와 함께 I형 사이토카인 수용체의 하나의 서브유닛을 형성하는 막 관통 단백질이다. 특이성은 신호 전달에 직접적으로 참여하지 않는 개별적인 IL-11 α -수용체(IL-11R α)를 통해 얻어지지만, α -수용체에 대한 초기 사이토카인 결합은 β -수용체와의 최종 복합체 형성을 유도한다. IL-11은 하류 신호 전달 경로를 활성화시키며, 이는 대부분 미토젠 활성화 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 캐스캐이드 및 야누스 키나아제(Janus kinase)/신호 전달 인자(signal transducer)와 전사 활성 인자(Jak/STAT) 경로이다(Garbers and Scheller, 위 참조).
- [0051] (22개 아미노산 신호 펩타이드를 포함하는) 인간 gp130은 918개 아미노산 단백질이고, 성숙 형태는 597개 아미노산의 세포 외 도메인, 22개 아미노산의 막 관통 도메인 및 277개 아미노산의 세포 내 도메인을 포함하는, 866개 아미노산이다. 단백질의 세포 외 도메인은 gp130의 사이토카인 결합 모듈(cytokine-binding module, CBM)을 포함한다. gp130의 CBM은 gp130의 Ig 유사 도메인 D1, 및 피브로넥틴-III형 도메인 D2와 D3을 포함한다. 인간 gp130의 아미노산 서열은 Genbank 등록번호 NP_002175.2로부터 이용 가능하다.
- [0052] 인간 IL-11R α 는 422개 아미노산 폴리펩타이드(Genbank 등록번호 NP_001136256.1 GI:218505839)이며, 컷과의 IL-11R α 와 약 85%의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 동일성을 공유한다(Du and Williams., Blood Vol, 89, No, 11, June 1, 1997). IL-11R α 의 두 가지 아이소형이 보고된 바 있는데, 그것들은 세포질 도메인이 다르다(Du and Williams, 위 참조). IL-11 수용체 α -사슬(IL-11R α)은 IL-6 수용체 α -사슬(IL-6R α)과 많은 구조적 및 기능적 유사성을 공유한다. 세포 외 도메인은 특징적인 보존된 Trp-Ser-X-Trp-Ser(WSXWS) 모티프를 포함하는 24%의 아미노산 동일성을 보여준다. 짧은 세포질 도메인(34개 아미노산)은 JAK/STAT 신호 전달 경로의 활성화에 필요한 박스 1과 2 영역이 결여되어 있다.
- [0053] IL-11R α 는 낮은 친화도(Kd 약 10 nmol/L)로 그것의 리간드와 결합하며, 단독으로는 생물학적 신호를 전달하기에 불충분하다. 신호 전달을 할 수 있는 고 친화성 수용체(Kd 약 400 내지 800 pmol/L)의 생성에는 IL-11R α 및 gp130의 공동 발현이 필요하다(Curtis et al (Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12; Hilton et al., EMBO J 13:4765, 1994; Nandurkar et al., Oncogene 12:585, 1996). IL-11의 세포 표면 IL-11R α 에 대한 결합은 헤테

로다이며화, 티로신 인산화, gp130 및 MAPK의 활성화 및/또는 상기 기술된 바와 같은 Jak/STAT 신호 전달을 유도한다.

- [0054] 첫과의 IL-11 상의 수용체 결합 부위가 맵핑되었고, 세 개의 부위 - 부위 I, II 및 III이 확인되었다. gp130에 대한 결합은 부위 II 영역에서의 치환 및 부위 III 영역에서의 치환에 의해 감소된다. 자리 III 돌연변이체는 검출 가능한 작용제 활성을 전혀 나타내지 않으며, IL-11R α 길항제 활성을 갖고 있다(Cytokine Inhibitors Chapter 8; edited by Gennaro Ciliberto and Rocco Savino, Marcel Dekker, Inc. 2001).
- [0055] 원칙적으로, 가용성 IL-11R α 는 또한 IL-11과 생물학적 활성이 있는 가용성 복합체를 형성할 수 있어(Pflanz et al., 1999 FEBS Lett, 450, 117-122), IL-6과 유사하게 IL-11은 세포 표면 gp130과 결합하기 전에 경우에 따라 가용성 IL-11R α 와 결합할 수 있는 가능성을 높인다(Garbers and Scheller, 위 참조). Curtis 등(Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12)은 가용성의 첫과 IL-11 수용체 알파 사슬(soluble murine IL-11 receptor alpha chain, sIL-11R)의 발현을 기술하며, gp130을 발현하는 세포에서의 신호 전달을 조사하였다. gp130의 존재 및 막 관통 IL-11R의 부재하에서, sIL-11R은 M1 백혈병 세포의 IL-11 의존성 분화 및 Ba/F3 세포의 증식, 그리고 막 관통 IL-11R을 통한 신호 전달과 유사한 gp130, STAT3 및 SHP2의 인산화를 포함하는 초기 세포 내 이벤트를 매개하였다.
- [0056] 본 명세서에서, IL-11 수용체(IL-11R)는 IL-11과 결합할 수 있고, gp130을 발현하는 세포에서 신호 전달을 유도할 수 있는 폴리펩타이드를 지칭한다. IL-11 수용체는 임의의 종으로부터 유래될 수 있고, 임의의 종으로부터의 IL-11 수용체의 아이소형, 단편, 변이체 또는 동족체를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 종은 인간(호모 사피엔스)이다. 일부 구현예에서, IL-11 수용체는 IL-11R α 일 수 있다. IL-11R α 의 아이소형, 단편, 변이체 또는 동족체는 선택적으로 주어진 종, 예를 들어 인간으로부터의 IL-11R α 의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. IL-11R α 의 아이소형, 단편, 변이체 또는 동족체는 선택적으로 (바람직하게는, 동일한 종으로부터의) IL-11에 결합하고, IL-11R α 및 gp130을 발현하는 세포에서 신호 전달을 자극하는 능력을 특징으로 할 수 있다(예를 들어, 문헌[Curtis et al. Blood, 1997, 90(11)]; 또는 문헌[Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80]에 기술된 바와 같다). IL-11 수용체의 단편은 (아미노산의 수에 따른) 임의의 길이일 수 있지만, 선택적으로 성숙 IL-11R α 의 길이의 적어도 25%일 수 있고, 성숙 IL-11R α 의 길이의 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중의 하나의 최대 길이를 가질 수 있다. IL-11 수용체 단편의 단편은 10개 아미노산의 최소 길이 및 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 또는 415개 아미노산 중 하나의 최대 길이를 가질 수 있다.
- [0057] IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제
- [0058] IL-11 신호 전달 경로는 IL-11 신호 전달의 억제를 위한 다양한 경로를 제공한다. 예를 들어, 억제제는 IL-11 수용체에 대한 IL-11의 결합을 방지하거나 감소시킴으로써 달성될 수 있다. 그 결과, 적합한 제제는 IL-11 또는 그것의 수용체 중 어느 하나를 표적으로 할 수 있다.
- [0059] 일부 구현예에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제는 IL-11에 결합하고, 예를 들어 IL-11 수용체를 통해 IL-11 매개성 신호 전달을 방지하거나 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제는 IL-11 수용체에 결합하고, IL-11 자극성 신호 전달을 방지하거나 감소시킬 수 있다.
- [0060] IL-11에 결합하는 제제는 IL-11 수용체에 대한 IL-11의 결합을 차단함으로써 및/또는 IL-11의 수용체에 대한 결합에 이용 가능한 IL-11의 양을 감소시킴으로써 IL-11 매개성 신호 전달을 억제할 수 있다. 적절한 IL-11 결합제는 IL-11 억제제 또는 IL-11 길항제일 수 있다.
- [0061] 본 발명에 따른 IL-11 결합제, 예를 들어 항 IL-11 항체는 다음 특성 중 적어도 하나를 나타낼 수 있다:
- [0062] a) 인간 IL-11에 1 μ M 이하, 바람직하게는 $\leq 1 \mu$ M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM 또는 ≤ 100 pM 중 하나의 K_D 로 결합한다;
- [0063] b) 예를 들어, 세포가 IL-11R α 및 gp130을 공동 발현하는 세포 기반의 검정법에서, IL-11R α 수용체를 통한 IL-11 매개성 신호 전달을 억제한다. 적절한 세포 기반의 검정법은 예를 들어, 문헌[Curtis et al. Blood, 1997, 90(11)] 및 문헌[Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80]에 기술된 3 H-티미딘 도입 (incorporation) 및 Ba/F3 세포 증식 검정법이다. 예를 들어, IL-11 결합제에 대한 IC $_{50}$ 은 인간 IL-11 및 IL-11

결합제의 존재하에 IL-11R α 와 gp130을 발현하는 Ba/F3 세포를 배양하고, DNA로의 ^3H -티미딘 도입을 측정함으로써 결정될 수 있다. 적절한 IL-11 결합제는 이러한 검정법에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 바람직하게는 $\leq 5 \mu\text{g/ml}$, $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, $\leq 3.5 \mu\text{g/ml}$, $\leq 3 \mu\text{g/ml}$, $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0.9 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0.8 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0.7 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0.6 \mu\text{g/ml}$, 또는 $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ 중 하나의 IC₅₀을 나타낼 수 있다.

- [0064] c) 섬유아세포 증식, 예를 들어 심장/심방 섬유아세포의 증식을 억제한다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1으로 자극하고 본원에 기술된 바와 같이 세포 증식을 모니터링하는 검정법에서 평가될 수 있다.
- [0065] d) 예를 들어, 심장/심방 섬유아세포로부터 근섬유아세포 생성을 억제한다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1으로 자극하고 예를 들어, α SMA 수준을 측정하여 근섬유아세포 생성을 모니터링하는 검정법에서 평가될 수 있다.
- [0066] e) 섬유아세포, 예를 들어 심장/심방 섬유아세포에 의한 세포 외 매트릭스 생산을 억제한다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1으로 자극하고 세포 외 매트릭스 성분의 생산을 측정하는 검정법에서 평가될 수 있다.
- [0067] f) 섬유아세포, 예를 들어 심장/심방 섬유아세포에서 콜라겐 및/또는 페리오스틴(periostin) 유전자 또는 단백질 발현을 억제한다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1으로 자극하고 콜라겐 및/또는 페리오스틴 유전자 또는 단백질 발현을 측정하는 검정법에서 평가될 수 있다.
- [0068] IL-11 결합제는 임의의 종류일 수 있으나, 일부 구현예에서 IL-11 결합제는 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 압타머 또는 소분자일 수 있다.
- [0069] 적합한 항-IL-11 항체는 바람직하게는 IL-11(항원), 바람직하게는 인간 IL-11에 결합할 것이고, $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ 또는 $\leq 100 \text{ pM}$ 중 하나의 해리 상수(K_D)를 가질 수 있다. 표적에 대한 항체의 결합 친화도는 종종 그것의 해리 상수(K_D)로 기술된다. 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR)에 의해 또는 항체의 Fab 버전과 항원 분자를 이용하여 수행되는 방사선 표지 항원 결합 검정법(radiolabeled antigen binding assay, RIA)에 의해서와 같이 당해 분야에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0070] 항 IL-11 항체는 IL-11의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 길항제 항체일 수 있다.
- [0071] 항 IL-11 항체는 IL-11의 생물학적 효과, 예를 들어 IL-11 수용체를 통한 생산적인 신호 전달을 자극하는 IL-11의 능력을 중화시키는 중화(neutralising) 항체일 수 있다.
- [0072] 중화 활성은 T11 마우스 형질세포종(plasmacytoma) 세포주에서 IL-11 유도성 증식을 중화시키는 능력으로 측정될 수 있다(Nordan, R. P. *et al.* (1987) J. Immunol. **139**:813).
- [0073] 공지된 항 IL-11 항체의 예에는 단일클론 항체 클론 6D9A, 클론 KT8(애비오텍(Abbiotec)), 클론 M3103F11(바이오레전드(BioLegend)), 클론 1F1, 클론 3C6(아브노바 코포레이션(Abnova Corporation)), 클론 GF1(라이프스팬 바이오사이언스(LifeSpan Biosciences)), 클론 13455(소스 바이오사이언스(Source BioScience)) 및 클론 22626(알앤디 시스템즈(R & D Systems)), 문헌[Bockhorn *et al.* Nat. Commun. (2013) 4(0):1393]에서 사용됨; 단일클론 마우스 IgG_{2A}; 카탈로그 번호 MAB218; 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타 주)이 포함된다.
- [0074] 항체는 선택적으로, 인간, 예를 들어 재조합 인간, IL-6, CNTF, LIF, OSM, CLC 또는 CT-1 중 하나 이상과 실질적으로 어떠한 교차 반응성도 나타내지 않도록 선택될 수 있다.
- [0075] 펩타이드 또는 폴리펩타이드 기반의 IL-11 결합제는 IL-11 수용체, 예를 들어 IL-11 수용체의 IL-11 결합 단편을 기반으로 할 수 있다. 일 구현예에서, 적절한 IL-11 결합제는 IL-11R α 사슬의 IL-11 결합 단편을 포함할 수 있고, 바람직하게는 가용성일 수 있고/있거나 막 관통 도메인(들) 중 하나 이상 또는 이의 전부를 제외할 수 있다. 이러한 분자는 유인 수용체로 설명될 수 있다.
- [0076] Curtis 등(Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12)은 가용성의 쥐과 IL-11 수용체 알파 사슬(sIL-11R)이 막 관통 IL-11R 및 gp130을 발현하는 세포에서 시험했을 때 IL-11의 활성을 상쇄시킬 수 있었다고 보고하였다. 그들은 sIL-11R에 의해 관찰된 IL-11 길항작용은 이미 막 관통 IL-11R을 발현하는 세포 상에서의 제한적인 수의 gp130 분자에 의존한다고 제안하였다.

- [0077] 신호 전달의 억제 및 치료 개입에 대한 근거로서 가용성 유인 수용체의 사용은 다른 신호 전달 분자:수용체 쌍, 예를 들어 VEGF와 VEGF 수용체에 대해서도 보고된 바 있다(De-Chao Yu et al., Molecular Therapy (2012); 20 5, 938-947; Konner and Dupont Clin Colorectal Cancer 2004 Oct;4 Suppl 2:S81-5).
- [0078] 이와 같이, 일부 구현예에서, IL-11 결합제는 유인 수용체, 예를 들어 가용성 IL-11 수용체의 형태로 제공될 수 있다. 유인 수용체에 의해 제공되는 IL-11에 대한 경쟁은 IL-11 길항제 작용을 초래하는 것으로 보고된 바 있다 (Curtis et al., 위 참조).
- [0079] 유인 IL-11 수용체는 바람직하게는 IL-11 및/또는 IL-11 함유 복합체와 결합하여 이들 중을 gp130, IL-11R α 및/또는 gp130:IL-11R α 수용체에 대한 결합에 이용할 수 없게 만든다. 이와 같이, 그것들은 에타너셉트(etanercept)가 TNF α 에 대해 유인 수용체로서 작용하는 것과 대체로 동일한 방식으로 IL-11 및 IL-11 함유 복합체에 대해 '유인' 수용체로서 작용한다. IL-11 매개성 신호 전달은 유인 수용체의 부재하에서의 신호 전달 수준과 비교하여 감소된다.
- [0080] 유인 IL-11 수용체는 바람직하게는 하나 이상의 사이토카인 결합 모듈(cytokine binding module, CBM)을 통해 IL-11에 결합한다. CBM은 IL-11에 대한 자연 발생적인 수용체 분자의 CBM이거나, 이로부터 유래되거나, 이에 상응한다. 예를 들어, 유인 IL-11 수용체는 gp130 및/또는 IL-11R α 의 CBM으로부터의, 또는 이로부터 유래되거나, 이에 상응하는 하나 이상의 CBM을 포함하거나 그것들로 이루어질 수 있다.
- [0081] 일부 구현예에서, 유인 IL-11 수용체는 gp130의 사이토카인 결합 모듈에 상응하는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 유인 IL-11 수용체는 IL-11R α 의 사이토카인 결합 모듈에 상응하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 여기서, 주어진 펩타이드/폴리펩타이드의 참고(reference) 영역 또는 서열에 '상응하는(correspond)' 아미노산 서열은 참고 영역/서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%의 서열 동일성, 예를 들어 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성 중 하나를 나타낸다. gp130, IL-11R α 및 IL-11은 임의의 종으로부터 유래될 수 있고, 임의의 종으로부터의 아이소형, 단편, 변이체 또는 동족체를 포함한다.
- [0082] 일부 구현예에서, 유인 수용체는 예를 들어, 적어도 100 μ M 이하의 결합 친화력, 선택적으로 10 μ M 이하, 1 μ M 이하, 100 nM 이하 또는 약 1 내지 100 nM 중 하나의 결합 친화력으로 IL-11과 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 유인 수용체는 IL-11 결합 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있고, 선택적으로 막 관통 도메인의 전부 또는 부분이 없을 수 있다. 유인 수용체는 선택적으로 면역 글로불린 불변 영역, 예를 들어 IgG Fc 영역에 융합될 수 있다.
- [0083] 일부 구현예에서, IL-11 결합제는 IL-11의 소분자 억제제, 예를 들어 문헌[Lay et al., Int. J. Oncol. (2012); 41(2): 759-764]에 기술된 IL-11 억제제의 형태로 제공될 수 있다.
- [0084] IL-11 수용체(IL-11R)에 결합하는 제제는 IL-11R에 대한 IL-11의 결합을 차단하거나 gp130 공수용체를 통한 신호 전달을 방지함으로써 IL-11 매개성 신호 전달을 억제할 수 있다. 적절한 IL-11R 결합제는 IL-11R 억제제 또는 IL-11R 길항제일 수 있다. 바람직한 구현예에서, IL-11R은 IL-11R α 이고, 적절한 결합제는 IL-11R α 폴리펩타이드와 결합할 수 있고, IL-11R α 의 억제제 또는 길항제일 수 있다.
- [0085] 본 발명에 따른 IL-11R 결합제, 예를 들어 항 IL-11R 항체는 다음 특성 중 적어도 하나를 나타낼 수 있다:
- [0086] (a) 인간 IL-11R에 1 μ M 이하, 바람직하게는 \leq 1 μ M, \leq 100 nM, \leq 10 nM, \leq 1 nM 또는 \leq 100 pM 중 하나의 K_D 로 결합한다;
- [0087] (b) 예를 들어, 세포가 IL-11R α 및 gp130를 공동 발현하는 세포 기반의 검정법에서, IL-11R 신호 전달을 억제한다. 적절한 세포 기반의 검정법은 예를 들어, 문헌[Curtis et al. Blood, 1997, 90(11)] 및 문헌[Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80]에 기술된 3 H-티미딘 도입 및 Ba/F3 세포 증식 검정법이다. 예를 들어, IL-11R 결합제에 대한 IC₅₀은 인간 IL-11 및 IL-11R 결합제의 존재하에 IL-11R α 와 gp130를 발현하는 Ba/F3 세포를 배양하고, DNA로의 3 H-티미딘 도입을 측정함으로써 결정될 수 있다. 적절한 IL-11R 결합제는 이러한 검정법에서 10 μ g/ml 이하, 바람직하게는 \leq 5 μ g/ml, \leq 4 μ g/ml, \leq 3.5 μ g/ml, \leq 3 μ g/ml, \leq 2 μ g/ml, \leq 1 μ g/ml, \leq 0.9 μ g/ml, \leq 0.8 μ g/ml, \leq 0.7 μ g/ml, \leq 0.6 μ g/ml, 또는 \leq 0.5 μ g/ml 중 하나의 IC₅₀을 나타낼 수 있다.

- [0088] (c) 섬유아세포 증식, 예를 들어 심장/심방 섬유아세포의 증식을 억제한다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1으로 자극하고 본원에 기술된 바와 같이 세포 증식을 모니터링하는 검정법에서 평가될 수 있다.
- [0089] (d) 예를 들어, 심장/심방 섬유아세포로부터 근섬유아세포 생성을 억제한다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1으로 자극하고 예를 들어, α SMA 수준을 측정하여 근섬유아세포 생성을 모니터링하는 검정법에서 평가될 수 있다.
- [0090] (e) 섬유아세포, 예를 들어 심장/심방 섬유아세포에 의한 세포 외 매트릭스 생산을 억제한다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1으로 자극하고 세포 외 매트릭스 성분의 생산을 측정하는 검정법에서 평가될 수 있다.
- [0091] (f) 섬유아세포, 예를 들어 심장/심방 섬유아세포에서 콜라겐 및/또는 페리오스틴 유전자 또는 단백질 발현을 억제한다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1으로 자극하고 콜라겐 및/또는 페리오스틴 유전자 또는 단백질 발현을 측정하는 검정법에서 평가될 수 있다.
- [0092] IL-11R 결합제는 임의의 종류일 수 있으나, 일부 구현예에서, IL-11R 결합제는 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 압타머 또는 소분자일 수 있다.
- [0093] 적절한 항 IL-11R 항체는 바람직하게는 IL-11R(항원), 바람직하게는 인간 IL-11R에 결합할 것이고, $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ 또는 $\leq 100 \text{ pM}$ 중 하나의 해리 상수(K_D)를 가질 수 있다. 그것의 표적에 대한 항체의 결합 친화력은 종종 그것의 해리 상수(K_D)로 기술된다. 결합 친화력은 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해, 또는 항체의 Fab 버전과 항원 분자를 이용하여 수행되는 방사선 표지 항원 결합 검정법(RIA)에 의해서와 같이 당해 분야에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0094] 항 IL-11R 항체는 IL-11R의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 길항 항체(antagonist antibody)일 수 있다. 항 IL-11R 항체는 IL-11R의 임의의 기능, 특히 신호 전달을 억제하거나 감소시키는 길항 항체일 수 있다. 예를 들어, 길항 IL-11R 항체는 IL-11R에 대한 IL-11의 결합을 억제하거나 방지할 수 있고, 또는 예를 들어, IL-11 결합에 반응하여 생산적 신호 전달을 할 수 있는 기능적 수용체 복합체를 형성하기 위해 gp130과 IL-11R α 가 결합(association)하는 것을 억제하거나 방지할 수 있다.
- [0095] 항 IL-11R 항체는 IL-11R의 생물학적 효과, 예를 들어 IL-11의 결합에 의해 매개되는 생산적 신호 전달을 개시하는 IL-11R의 능력을 중화시키는 중화 항체일 수 있다.
- [0096] 중화 활성은 T11 마우스 형질세포종 세포주에서 IL-11 유도성 증식을 중화시키는 능력으로 측정될 수 있다 (Nordan, R. P. *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**:813).
- [0097] 공지된 항 IL-11R 항체의 예는 단일클론 항체 클론 025(시노 바이올로지컬(Sino Biological)), 클론 EPR5446(아브캄(Abcam)), 클론 473143(알앤디 시스템즈(R & D Systems), US 2014/0219919 A1에 기술된 클론 8E2와 8E4 및 문헌[Blanc *et al.* (*J. Immunol Methods.* 2000 Jul 31;241(1-2):43-59)]에 기술된 단일클론 항체가 포함한다.
- [0098] 펩타이드 또는 폴리펩타이드 기반의 IL-11R 결합제는 IL-11, 예를 들어 IL-11의 돌연변이체(mutant), 변이체(variant) 또는 결합 단편(binding fragment)을 기반으로 할 수 있다. 적절한 펩타이드 또는 폴리펩타이드 기반의 제제는 신호 전달의 개시를 야기하지 않거나 차선적인(sub-optimal) 신호 전달을 생산하는 방식으로 IL-11R에 결합할 수 있다. 이 종류의 IL-11 돌연변이체는 내생성(endogenous) IL-11의 경쟁적 억제제로서 작용할 수 있다.
- [0099] 예를 들어, W147A는 IL-11 길항제로서 아미노산 147번이 트립토판에서 알라닌으로 돌연변이 된 것으로, 이는 IL-11의 소위 '부위 III(site III)'을 파괴한다. 이 돌연변이체는 IL-11R에 결합할 수 있지만, gp130 호모다이머와는 결합하지 못하여 IL-11 신호 전달을 효율적으로 차단한다(Underhill-Day *et al.*, 2003; *Endocrinology* 2003 Aug;144(8):3406-14). 또한, Lee 등(*Am J respire Cell Mol Biol.* 2008 Dec; 39(6):739-746)은 IL-11R α 에 대한 IL-11의 결합을 특이적으로 억제할 수 있는 IL-11 길항 돌연변이체("뮤테인(mutein)")의 생성을 보고하고 있다.
- [0100] 문헌[Menkhorst *et al.*(*Biology of Reproduction* May 1, 2009 vol.80 no.5 920-927)]은 폐경화된 IL-11 길항제인 PEGIL11A(씨에스엘 리미티드(CSL Limited), Parkville, Victoria, Australia)가 암컷 마우스에서 IL-11의 작용을 억제하는데 효과적임을 기술하고 있다.

- [0101] 문헌[Pasqualini et al. Cancer (2015) 121(14):2412421]은 IL-11R α 에 결합할 수 있는 리간드-유도성(ligand-directed)의 펩타이드 모방체(peptidomimetic) 약물인, 골 전이 표적형 펩타이드 모방체-11(bone metastasis-targeting peptidomimetic-11, BMTP-11)을 기술하고 있다.
- [0102] 일부 구현예에서, IL-11R 결합제는 IL-11R의 소분자 억제제의 형태로 제공될 수 있다.
- [0103] 본 발명자들은 IL-11 발현의 상향 조절이 섬유증의 분자적 메커니즘과 일치하며, IL-11 활성의 억제가 섬유증에 대한 분자적 기반의 감소를 초래한다는 점을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 일부 양태에서, 섬유증의 치료, 예방 또는 경감은 대상체의 세포에 의한, 예를 들어 섬유아세포 또는 근섬유아세포에 의한 IL-11의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제의 투여에 의해 제공될 수 있다.
- [0104] 적절한 제제는 임의의 종류일 수 있으나, 일부 구현예에서, IL-11의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제는 소분자 또는 올리고뉴클레오티드일 수 있다.
- [0105] 문헌[Taki et al (Clin Exp Immunol. 1998 Apr; 112(1): 133-138)]은 인도메타신, 텍사메타손 또는 인터페론 감마(IFN γ)를 이용하여 치료 시 류마티스 윤활 세포에서의 IL-11의 발현 감소를 보고하고 있다.
- [0106] 일부 구현예에서, IL-11의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제는 IL-11의 발현을 억제(repressing)하거나 침묵(silencing)시킬 수 있는 올리고뉴클레오티드일 수 있다.
- [0107] 따라서, 본 발명은 IL-11 발현의 치료적 하향 조절을 위한 당해 분야에 공지된 기술의 사용도 포함한다. 이것들은 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 RNA 간섭(RNA interference, RNAi)의 사용을 포함한다. 본 발명의 다른 양태에서와 같이, 이들 기술은 섬유증의 치료에 이용될 수 있다.
- [0108] 따라서, 본 발명의 일 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법으로서, 치료학적 유효량의 IL-11의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 제제는 IL-11의 발현을 억제하거나 침묵시킬 수 있는 치료적 올리고뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0109] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법으로서, 치료학적 유효량의 IL-11의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 제제는 대상체의 세포에서 발현될 수 있는 치료적 올리고뉴클레오티드를 암호화하는 올리고뉴클레오티드 벡터, 선택적으로 바이러스 벡터를 포함하고, 발현된 치료적 올리고뉴클레오티드는 IL-11의 발현을 억제하거나 침묵시킬 수 있는 방법이 제공된다.
- [0110] 제제의 IL-11의 발현을 방지하거나 감소시키는 능력은 섬유아세포 또는 근섬유아세포, 예를 들어 심장/심방 섬유아세포 또는 근섬유아세포에 의한 IL-11 유전자 또는 단백질 발현을 억제하는 데 대한 제제의 능력을 결정함으로써 분석될 수 있다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포 또는 근섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1로 자극하고, IL-11 유전자 또는 단백질 발현을 측정하는 검정법으로 평가될 수 있다.
- [0111] IL-11에 대한 결합 및 생산적 신호 전달의 개시에 이용할 수 있는 IL-11R의 양을 감소시키는 것은 IL-11 자극성 신호 전달의 수준을 감소시키는 대안적인 수단을 제공한다. 따라서, 본 발명의 관련 양태에서, 섬유증의 치료, 예방 또는 경감은 대상체의 세포에 의한, 예를 들어 섬유아세포 또는 근섬유아세포에 의한 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제의 투여에 의해 제공될 수 있다.
- [0112] 일부 구현예에서, IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제는 IL-11R의 발현을 억제하거나 침묵시킬 수 있는 올리고뉴클레오티드일 수 있다.
- [0113] 따라서, 본 발명은 IL-11R 발현의 치료적 하향 조절을 위한 당해 분야에 공지된 기술의 사용도 포함한다. 이것들은 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 RNA 간섭(RNAi)의 사용을 포함한다. 본 발명의 다른 양태에서와 같이, 이들 기술은 섬유증의 치료에 이용될 수 있다.
- [0114] 따라서, 본 발명의 일 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법으로서, 치료학적 유효량의 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 제제는 IL-11R의 발현을 억제하거나 침묵시킬 수 있는 치료적 올리고뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0115] 본 발명의 또 다른 양태에서, 섬유증의 치료 또는 예방 방법으로서, 치료학적 유효량의 IL-11R의 발현을 방지할 수 있거나 감소시킬 수 있는 제제를 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 제제는 대상체의 세포에서 발현될 수 있는 치료적 올리고뉴클레오티드를 암호화하는 올리고뉴클레오티드 벡터, 선택적으로

바이러스 벡터를 포함하고, 발현된 치료적 올리고뉴클레오타이드는 IL-11R의 발현을 억제하거나 침묵시킬 수 있는 방법이 제공된다.

- [0116] IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시키는 제제의 능력은 섬유아세포 또는 근섬유아세포, 예를 들어 심장/심방 섬유아세포 또는 근섬유아세포에 의한 IL-11R 유전자 또는 단백질 발현을 억제하는 능력을 결정함으로써 분석될 수 있다. 이것은 예를 들어, 섬유아세포 또는 근섬유아세포를 IL-11 또는 TGF β 1로 자극하고, IL-11 유전자 또는 단백질 발현을 측정하는 검정법으로 평가될 수 있다.
- [0117] 바람직한 구현예에서, IL-11R은 IL-11R α 일 수 있다.
- [0118] 항체
- [0119] 본 명세서에서, "항체"는 항체의 단편 또는 유도체, 또는 합성 항체 또는 합성 항체 단편을 포함한다.
- [0120] 항체는 단리된 형태 또는 정제된 형태로 제공될 수 있다. 항체는 약학적 조성물 또는 약제로 제형화될 수 있다.
- [0121] 단일클론 항체 기술과 관련된 현재의 기술을 고려하여, 항체는 대부분의 항원에 대해 제조될 수 있다. 항원 결합 부분은 항체의 일부분(예를 들어, Fab 단편) 또는 합성 항체 단편(예를 들어, 단일 사슬 Fv 단편[ScFv])일 수 있다. 선택된 항원에 대한 적절한 단일클론 항체는 예를 들어, 문헌["Monoclonal Antibodies: A manual of techniques ", H Zola (CRC Press, 1988)]과 문헌["Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications ", J G R Hurrell (CRC Press, 1982)]에 개시된 기술과 같은 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다. 키메라 항체는 Neuberger 등(1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799)에 의해 논의되고 있다.
- [0122] 단일 클론 항체(monoclonal antibody, mAb)는 본 발명의 방법에 유용하며, 항원의 단일 에피토프를 특이적으로 표적화하는 균일(homogenous) 항체 집단이다.
- [0123] 다클론 항체는 본 발명의 방법에 유용하다. 단일 특이적(monospecific) 다클론 항체가 바람직하다. 적절한 다클론 항체는 당해 분야에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0124] Fab 단편 및 Fab₂ 단편과 같은 항체의 항원 결합 단편 또한 유전자 조작에 의해 생성된 항체 및 항원 단편과 같이 이용되거나 제공될 수 있다. 항체의 가변 중쇄(V_H) 및 가변 경쇄(V_L) 도메인은 항원 인식에 관여하며, 이는 초기 프로테아제 소화 실험에 의해 최초로 인식된 사실이다. 추가 확인은 설치류 항체의 "인간화(humanisation)"에 의해 발견되었다. 설치류 기원의 가변 도메인은 인간 기원의 불변 도메인에 융합될 수 있으며, 그 결과로 생긴 항체는 설치류 부모 항체의 항원 특이성을 유지한다(Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).
- [0125] 항원 특이성이 가변 도메인에 의해 제공되며 불변 도메인과는 무관하다는 점이 모두 하나 이상의 가변 도메인을 함유하는 항체 단편의 세균 발현을 수반하는 실험으로부터 알려져 있다. 이들 분자는 Fab 유사 분자(Better et al (1988) Science 240, 1041); Fv 분자(Skerra et al (1988) Science 240, 1038); V_H 및 V_L 파트너 도메인이 가요성 올리고펩타이드를 통해 연결된 단일 사슬 Fv(single-chain Fv, ScFv) 분자(Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) 및 단리된 V 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체(dAb)(Ward et al (1989) Nature 341, 544)를 포함한다. 특이적인 결합 부위를 보유하는 항체 단편의 합성과 관련된 기술에 대한 일반적인 검토는 문헌[Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299]에서 찾아볼 수 있다.
- [0126] "ScFv 분자"는 V_H 및 V_L 파트너 도메인이 예를 들어, 가요성 올리고펩타이드에 의해 공유적으로 연결된 분자를 의미한다.
- [0127] Fab, Fv, ScFv 및 dAb 항체 단편은 모두 대장균에서 발현되고 분비될 수 있으므로, 다량의 상기 단편을 용이하게 생산할 수 있다.
- [0128] 전체 항체 및 F(ab')₂ 단편은 "2가(bivalent)"이다. "2가"는 상기 항체 및 F(ab')₂ 단편이 두 개의 항원 결합 부위를 가지고 있음을 의미한다. 대조적으로, Fab, Fv, ScFv 및 dAb 단편은 1가(monovalent)로, 오로지 하나의 항원 결합 부위를 가지고 있다. IL-11 또는 IL-11R에 결합하는 합성 항체 또한 당해 분야에 잘 알려져 있는 바와 같은 파지 디스플레이 기술을 이용해서도 제조할 수 있다.
- [0129] 항체는 비변형 모 항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화도가 개선된, 변형된 항체가 생성되는 친화도 성숙

(affinity maturation) 과정에 의해 생성될 수 있다. 친화도 성숙 항체는 당해 분야, 예를 들어 문헌[Marks *et al.*, *Rio/Technology* 10:779-783 (1992); Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):331 0-15 9 (1995); 및 Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)]에 공지된 절차에 의해 생산될 수 있다.

[0130] 본 발명에 따른 항체는 바람직하게는, IL-11 또는 IL-11R에 대해 특이적인 결합을 나타낸다. 표적 분자에 특이적으로 결합하는 항체는 바람직하게는, 그것이 다른 표적에 결합하는 것보다 더 큰 친화도 및/또는 더 큰 지속 시간으로 표적과 결합한다. 일 구현예에서, 관련 없는 표적에 대한 항체의 결합 정도는 예를 들어, ELISA에 의해 또는 방사성 면역 측정법(RIA)에 의해 측정된 바에 따르면, 표적에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 대안적으로, 결합 특이성은 결합 친화도로 반영될 수 있는데, 항체는 IL-11 또는 IL-11R에 대해 또 다른 표적 분자, 예를 들어 IL-6 또는 IL-6 수용체와 같은 IL-11 패밀리의 또 다른 구성원을 향한 항체의 K_D 보다 적어도 0.1 자릿수(즉, 0.1×10^n , 여기서 n 은 자릿수를 나타내는 정수) 더 큰 K_D 로 결합한다. 이것은 선택적으로 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 또는 2.0 중 하나일 수 있다.

[0131] 항체는 검출 가능하게 표지될 수 있거나, 적어도 검출 가능하다. 이러한 항체는 생체 내(*in vivo*)(예를 들어, 영상화 방법) 및 시험관 내(*in vitro*)(예를 들어, 검정법) 적용 모두에 유용하다. 예를 들어, 항체는 방사성 원자 또는 착색된 분자 또는 형광 분자 또는 임의의 다른 방식으로 용이하게 검출될 수 있는 분자로 표지될 수 있다. 적절한 검출 가능한 분자는 형광 단백질, 루시페라제, 효소 매트릭스 및 방사성 표지를 포함한다. 결합 모이 어티는 검출 가능한 표지로 직접적으로 표지될 수 있거나, 간접적으로 표지될 수 있다. 예를 들어, 결합 모이 어티는 그 자체가 표지된 또 다른 항체에 의해 검출될 수 있는 표지되지 않은 항체일 수 있다. 대안적으로, 2차 항체가 바이오틴에 결합될 수 있고, 바이오틴에 대한 표지된 스트렙타비딘의 결합이 1차 항체를 간접적으로 표지하는 데 이용된다.

[0132] 본 발명의 양태는 이중 특이적 항체가 두 종류의 항원과 결합하도록, 예를 들어 두 개의 상이한 항체의 두 개의 상이한 단편으로 구성된 이중 특이적 항체를 포함한다. 항원 중 하나는 IL-11 또는 IL-11R이고, 이중 특이적 항체는 IL-11 또는 IL-11R에 결합하는 본원에 기술된 단편을 포함한다. 항체는 임의의 원하는 항원일 수 있는 2차 항원에 대한 친화도를 갖는 상이한 단편을 함유할 수 있다. 이중 특이적 항체의 제조 기술은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Mueller, D *et al.*, (2010 *Biodrugs* **24** (2): 89-98), Wozniak-Knopp G *et al.*, (2010 *Protein Eng Des* **23** (4): 289-297. Baeuerle, PA *et al.*, (2009 *Cancer Res* **69** (12): 4941-4944) 참조.

[0133] 일부 구현예에서, 이중 특이적 항체는 IL-11 또는 IL-11R 결합 항체 또는 항체 단편의 V_H 와 V_L 및 또 다른 항체 또는 항체 단편의 V_H 와 V_L 을 포함하는, 두 개의 단일 사슬 가변 단편(scFV) 포맷의 융합 단백질로서 제공된다.

[0134] 이중 특이적 항체 및 이중 특이적 항원 결합 단편은 전체가 본 설명에 참조로서 포함된 문헌[Kontermann MAb 2012, 4(2): 182-197]에 기술된 포맷과 같은, 임의의 적합한 포맷으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 이중 특이적 항체 또는 이중 특이적 항원 결합 단편은 이중 특이적 항체 접합체(conjugate)(예를 들어, IgG2, F(ab')₂ 또는 CovX-바디), 이중 특이적 IgG 또는 IgG 유사 분자(예를 들어, IgG, scFv₄-Ig, IgG-scFv, scFv-IgG, DVD-Ig, IgG-sVD, sVD-IgG, 투인원(2 in 1)-IgG, mAb², 또는 탠덤 커먼 LC(Tandemab common LC)), 비대칭성 이중 특이적 IgG 또는 IgG 유사 분자(예를 들어, kih IgG, kih IgG 커먼(common) LC, 크로스맵(CrossMab), kih IgG-scFab, mAb-Fv, 전하쌍 또는 SEED-바디), 소형 이중 특이적 항체 분자(예를 들어, 디아바디(Db), dsDb, DART, scDb, tandAbs, 탠덤 scFv(taFv), 탠덤 dAb/VHH, 트리플 바디, 트리플 헤드, Fab-scFv, 또는 F(ab')₂-scFv₂), 이중 특이적 Fc 및 C_H3 융합 단백질(예를 들어, taFv-Fc, 디-디아바디, scDb-C_H3, scFv-Fc-scFv, HCab-VHH, scFv-kih-Fc, 또는 scFv-kih-C_H3), 또는 이중 특이적 융합 단백질(예를 들어, scFv₂-알부민, scDb-알부민, taFv-독소, DNL-Fab₃, DNL-Fab₄-IgG, DNL-Fab₄-IgG-사이토카인₂)일 수 있다. 특히, 문헌[Kontermann MAb 2012, 4(2): 182-19]의 도 2 참조.

[0135] 이중 특이적 항체의 생산 방법은 예를 들어, 전체가 본 설명에 참조로서 포함된 문헌[Segal and Bast, 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13.2.13.1-2.13.16]에 기술된 바와 같이, 예를 들어 환원성 이황화 결합 또는 비 환원성 티오에테르 결합으로, 항체 또는 항체 단편을 화학적으로 가교결합시키는 것을 포함한다. 예를 들어, *N*-석신이미딜-3-(-2-피리디리티오)-프로피오네이트

(SPDP)는 예를 들어, 힌지 영역 SH- 그룹을 통해 Fab 단편을 화학적으로 가교결합시키는 데 이용되어 이황화물 연결된 이중 특이적 F(ab)₂ 헤테로다이머를 생성할 수 있다.

- [0136] 이중 특이적 항체의 다른 생산 방법은 예를 들어, 문헌[D. M. and Bast, B. J. 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16]에 기술된 바와 같이, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜로 항체 생성 하이브리도마를 융합시켜 이중 특이적 항체를 분비할 수 있는 쿼드로마(quadroma) 세포를 생산하는 것을 포함한다.
- [0137] 또한, 이중 특이적 항체 및 이중 특이적 항원 결합 단편은 예를 들어, 문헌[Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition (Humana Press, 2012), at Chapter 40: Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and Farber-Schwarz)] 또는 문헌[French, How to make bispecific antibodies, Methods Mol. Med. 2000; 40:333-339]에 기술된 바와 같이, 예를 들어 항원 결합 분자를 위한 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 구조체로부터의 발현에 의해 재조합으로 생산될 수 있다.
- [0138] 예를 들어, 2개의 항원 결합 도메인(즉, IL-11 또는 IL-11R과 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 대한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인, 및 또 다른 표적 단백질에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인에 대한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인)에 대한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인을 암호화하고, 항원 결합 도메인들 사이에 적절한 링커 또는 이량체화 도메인을 암호화하는 서열을 포함하는 DNA 구조체는 분자 클로닝 기술에 의해 제조될 수 있다. 그 후, 재조합 이중 특이적 항체는 적절한 숙주 세포(예를 들어, 포유류 숙주 세포)에서 구조체의 발현(예를 들어, 시험관 내)에 의해 생산될 수 있고, 발현된 재조합 이중 특이적 항체는 선택적으로 정제될 수 있다.
- [0139] 압타머
- [0140] 핵산 리간드로도 지칭되는 압타머는 높은 특이성 및 높은 친화도로 표적 분자에 결합하는 능력을 특징으로 하는 핵산 분자이다. 현재까지 확인된 거의 모든 압타머는 비 자연발생적 분자이다.
- [0141] 주어진 표적(예를 들어, IL-11 또는 IL-11R)에 대한 압타머는 SELEXTM (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 방법으로 확인 및/또는 생산될 수 있다. 압타머 및 SELEX는 문헌[Tuerk and Gold (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science. 1990 Aug 3;249(4968):505-10)] 및 WO91/19813에 기술되어 있다.
- [0142] 압타머는 DNA 또는 RNA 분자일 수 있고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 압타머는 예를 들어, 당 및/또는 인산 및/또는 염기가 화학적으로 변형된, 화학적으로 개질된 핵산을 포함할 수 있다. 이러한 개질은 압타머의 안정성을 향상시키거나 압타머를 분해에 더 저항성을 나타내도록 만들 수 있고, 리보스의 2' 위치에 개질을 포함할 수 있다.
- [0143] 압타머는 당업자에게 잘 알려져 있는 방법에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 압타머는 예를 들어, 고체 지지체 상에서, 화학적으로 합성될 수 있다.
- [0144] 고체상 합성은 포스포라미다이트 화학을 이용할 수 있다. 간단히 설명하면, 고체 지지된 뉴클레오타이드를 탈트리틸화한 다음, 적절하게 활성화시킨 뉴클레오시드 포스포라미다이트와 결합시켜 포스포이트 트리에스테르 결합을 형성한다. 그런 다음, 커플링이 일어날 수 있고, 이어서 산화제, 전형적으로는 요오드로 포스포이트 트리에스테르를 산화시킨다. 그런 다음, 사이클을 반복하여 압타머를 조립(assemble)할 수 있다.
- [0145] 압타머는 단일클론 항체의 핵산 등가물로 간주될 수 있고, 종종 nM 또는 pM 범위의 K_d, 예를 들어 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM 중 하나 미만의 K_d를 갖는다. 단일클론 항체와 마찬가지로, 압타머는 시험관 내 또는 생체 내에서, 치료 및 진단적 적용에서의 사용을 포함하여, 표적 결합이 필요한 사실상 모든 상황에서 유용할 수 있다. 시험관 내 진단적 적용은 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 데 있어서의 사용을 포함할 수 있다.
- [0146] 본 발명에 따른 압타머는 정제된 형태 또는 단리된 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 압타머는 약학적 조성물 또는 의약으로 제형화될 수 있다.
- [0147] 적절한 압타머는 선택적으로 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, 또는 40개 뉴클레오타이드 중 하나의 최소 길이를 가질 수 있다.
- [0148] 적절한 압타머는 선택적으로 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38,

39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 또는 80개 뉴클레오타이드 중 하나의 최대 길이를 가질 수 있다.

[0149] 적절한 압타머는 선택적으로 길이가 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 또는 80개 뉴클레오타이드 중 하나의 길이를 가질 수 있다.

[0150] IL-11 또는 IL-11R 발현의 올리고뉴클레오타이드 억제

[0151] 올리고뉴클레오타이드 분자, 특히 RNA는 유전자 발현을 조절하는 데 활용될 수 있다. 이들은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)에 의한 mRNA의 표적화된 분해, 전사 후 유전자 침묵(post transcriptional gene silencing, PTG), 마이크로 RNA(miRNA)에 의한 mRNA의 발생적으로 조절된 서열 특이적 번역 억제(developmentally regulated sequence-specific translational repression) 및 표적화된 전사 유전자 침묵을 포함한다.

[0152] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상보적 서열 결합에 의해 표적 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 mRNA를 표적화하여 결합하는, 바람직하게는 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드이다. 표적 올리고뉴클레오타이드가 mRNA인 경우, mRNA에 대한 안티센스의 결합은 mRNA의 번역 및 유전자 생성물의 발현을 차단한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 센스 게놈 핵산과 결합하여 표적 뉴클레오타이드 서열의 전사를 억제하도록 설계될 수 있다.

[0153] IL-11에 대한 공지된 핵산 서열(예를 들어, 등록번호 BC012506.1 GI:15341754(인간), BC134354.1 GI:126632002(마우스), AF347935.1 GI:13549072(랫트)로 GenBank®로부터 이용할 수 있는 공지된 mRNA 서열) 및 IL-11R에 대한 공지된 핵산 서열(예를 들어, 등록번호 NM_001142784.2 GI:391353394(인간), NM_001163401.1 GI:254281268(마우스), NM_139116.1 GI:20806172(랫트)로 GenBank®로부터 이용할 수 있는 공지된 mRNA 서열)을 고려하여, IL-11 또는 IL-11R의 발현을 억제하거나 침묵하도록 올리고뉴클레오타이드를 설계할 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 임의의 길이일 수 있으나, 바람직하게는 짧을 수 있고, 예를 들어 100개 뉴클레오타이드 미만, 예를 들어 10-40개 뉴클레오타이드, 또는 20-50개 뉴클레오타이드일 수 있고, 표적 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 IL-11 또는 IL-11 mRNA에서 상응하는 길이의 뉴클레오타이드 서열에 대해 완전한 또는 근사한 상보성(complementarity)(예를 들어, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상보성)을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 서열의 상보성 영역은 임의의 길이를 가질 수 있지만, 바람직하게는 길이가 적어도 5개, 그리고 선택적으로 50개 이하의 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개 뉴클레오타이드 중 하나이다.

[0154] IL-11 또는 IL-11R 발현의 억제는 바람직하게는 세포, 예를 들어 섬유아세포 또는 근섬유아세포에 의해 발현된 IL-11 또는 IL-11R의 양의 감소를 초래할 것이다. 예를 들어, 주어진 세포에서, 적절한 핵산의 투여에 의한 IL-11 또는 IL-11R의 억제는 미처리 세포와 비교하여 그 세포에 의해 발현된 IL-11 또는 IL-11R의 양의 감소를 초래할 것이다. 억제는 부분적일 수 있다. 바람직한 억제 정도는 적어도 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 85% 또는 90% 중 하나이다. 90%와 100% 사이의 억제 수준은 발현 또는 기능의 '침묵(silencing)'으로 간주된다.

[0155] 특정 염색체 좌(loci)에서 이질염색질 복합체(heterochromatin complex)의 표적화 및 후성적(epigenetic) 유전자 침묵에 있어서 RNAi 기구 및 작은 RNA의 역할이 증명된 바 있다. RNA 간섭(RNAi)이라고도 알려져 있는 이중가닥 RNA(double-stranded RNA, dsRNA) 의존성 전사 후 침묵은, dsRNA 복합체가 단기간에 침묵을 위한 특정 상동성 유전자를 표적화할 수 있는 현상이다. 그것은 서열 동일성을 갖는 mRNA의 분해를 촉진하는 신호로서 작용한다. 20-nt의 siRNA는 일반적으로 유전자 특이적 침묵을 유도할 수 있을 만큼 충분히 길지만, 숙주 반응을 회피할 수 있을 만큼 짧다. 표적화된 유전자 생성물 발현의 감소는 몇몇 siRNA 분자들에 의해 유도되는 90% 침묵으로 광범위할 수 있다. RNAi 기반의 치료법은 다수의 징후에 대해 I상, II상 및 III상 임상 시험으로 진행되었다(Nature 2009 Jan 22; 457(7228):426-433).

[0156] 당해 분야에서, 이들 RNA 서열은 그 기원에 따라 "짧은 또는 작은 간섭 RNA"(siRNA) 또는 "마이크로RNA"(miRNA)라 지칭된다. 두 유형의 서열 모두 상보적 RNA에 결합하여 mRNA 제거를 유발하거나(RNAi) 단백질로의 mRNA 변

역을 정지시킴으로써 유전자 발현을 하향 조절하는 데 사용될 수 있다. siRNA는 긴 이중 가닥 RNA의 프로세싱에 의해 유래되며, 자연계에서 발견되는 경우는 전형적으로 외생성(exogenous) 기원이다. 마이크로 간섭 RNA(miRNA)는 짧은 헤어핀의 프로세싱에 의해 유래된, 내생적으로 암호화된 작은 비 암호화 RNA이다. siRNA 및 miRNA는 모두 RNA 절단 없이 부분적으로 상보적인 표적 서열을 포함하는 mRNA의 번역을 억제할 수 있고, 완전히 상보적인 서열을 포함하는 mRNA를 분해할 수 있다.

- [0157] 따라서, 본 발명은 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 하향 조절하기 위한 올리고뉴클레오타이드 서열의 용도를 제공한다.
- [0158] siRNA 리간드는 전형적으로 이중 가닥이며, 표적 유전자 기능의 RNA 매개성 하향 조절의 효과를 최적화하기 위해, siRNA 분자의 길이는, mRNA 표적의 siRNA에 의한 인식을 매개하는 RISC 복합체에 의한 siRNA의 정확한 인식을 확실히 하도록 선택하는 것이 바람직하며, 따라서 siRNA는 숙주 반응을 감소시킬 만큼 충분히 짧다.
- [0159] miRNA 리간드는 전형적으로 단일 가닥이며, 부분적으로 상보적인 영역을 가져 리간드가 헤어핀을 형성할 수 있게 한다. miRNA는 DNA로부터 전사되지만, 단백질로 번역되지 않는 RNA 유전자이다. miRNA 유전자를 코딩하는 DNA 서열은 miRNA보다 길다. 이 DNA 서열은 miRNA 서열 및 흡사한 역상보체(reverse complement)를 포함한다. 이 DNA 서열이 단일 가닥 RNA 분자로 전사될 때, miRNA 서열 및 그것의 역상보체 염기쌍은 부분적으로 이중 가닥의 RNA 세그먼트를 형성한다. 마이크로RNA 서열의 설계는 문헌[John et al, PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004]에 논의되어 있다.
- [0160] 전형적으로, siRNA 또는 miRNA의 효과를 모방하기 위한 RNA 리간드는 10개 내지 40개의 리보뉴클레오타이드(또는 이의 합성 유사체), 더욱 바람직하게는 17개 내지 30개 리보뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 19개 내지 25개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21개 내지 23개 리보뉴클레오타이드를 가진다. 이중 가닥 siRNA를 이용하는 본 발명의 일부 구현예에서, 분자는 예를 들어, 하나 또는 두 개의 (리보)뉴클레오타이드의 대칭성의 3' 돌출부(overhang), 전형적으로는 dTdT 3' 돌출부의 UU를 가질 수 있다. 본원에 제공된 개시 내용을 기초로, 당업자는 예를 들어, 앰비온(Ambion) siRNA 파인더와 같은 자원을 이용하여, 적절한 siRNA 및 miRNA 서열을 용이하게 설계할 수 있다. siRNA 및 miRNA 서열은 합성적으로 생산되고 외생적으로 첨가되어 유전자 하향 조절을 유발할 수 있거나, 발현 시스템(예를 들어, 벡터)을 이용하여 생산될 수 있다. 바람직한 구현예에서, siRNA는 합성적으로 합성된다.
- [0161] 긴 이중 가닥 RNA는 세포에서 프로세싱되어 siRNA를 생산할 수 있다(예를 들어, 문헌[Myers (2003) *Nature Biotechnology* 21:324-328] 참조). 긴 dsRNA 분자는 예를 들어, 하나 또는 두 개의 (리보)뉴클레오타이드의 대칭성 3' 또는 5' 돌출부를 가질 수 있거나, 평활 말단(blunt end)을 가질 수 있다. 긴 dsRNA 분자는 25개 이상의 뉴클레오타이드일 수 있다. 바람직하게는, 긴 dsRNA 분자는 25개 내지 30개 뉴클레오타이드 길이이다. 더욱 바람직하게는, 긴 dsRNA 분자는 25개 내지 27개 뉴클레오타이드 길이이다. 가장 바람직하게는, 긴 dsRNA 분자는 27개 뉴클레오타이드 길이이다. 30개 이상의 뉴클레오타이드 길이인 dsRNA는 벡터 pDECAP(Shinagawa et al., *Genes and Dev.*, 17, 1340-5, 2003)를 이용하여 발현될 수 있다.
- [0162] 또 다른 대안은 세포에서 짧은 헤어핀 RNA 분자(short hairpin RNA, shRNA)를 발현시키는 것이다. shRNA는 합성 siRNA보다 더욱 안정적이다. shRNA는 작은 루프 서열로 분리된 짧은 역반복 염기서열(short inverted repeats)로 구성된다. 하나의 역반복 염기서열은 유전자 표적에 대해 상보적이다. 세포에서, shRNA는 DICER에 의해 siRNA로 프로세싱되고, 이는 표적 유전자 mRNA를 분해하고 발현을 억제한다. 바람직한 구현예에서, shRNA는 벡터로부터 전사에 의해 (세포 내에서) 내생적으로 생성된다. shRNA는 인간 H1 또는 7SK 프로모터와 같은 RNA 중합효소 III 프로모터 또는 RNA 중합효소 II 프로모터의 제어하에 shRNA 서열을 암호화하는 벡터로 세포를 형질감염시킴으로써 세포 내에서 생성될 수 있다. 대안적으로, shRNA는 벡터로부터 전사에 의해 (시험관 내에서) 외생적으로 합성될 수 있다. 그런 다음, shRNA는 직접적으로 세포 내로 도입될 수 있다. 바람직하게는, shRNA 분자는 IL-11 또는 IL-11R의 부분 서열을 포함한다. 바람직하게는, shRNA 서열은 40개 내지 100개의 염기 길이, 더욱 바람직하게는 40개 내지 70개의 염기 길이이다. 헤어핀의 스템은 바람직하게는 19개 내지 30개의 염기쌍 길이이다. 스템은 헤어핀 구조를 안정화시키기 위해 G-U 쌍을 함유할 수 있다.
- [0163] siRNA 분자, 긴 dsRNA 분자 또는 miRNA 분자는 바람직하게는 벡터 내에 함유된 핵산 서열의 전사에 의해 재조합으로 제조될 수 있다. 바람직하게는, siRNA 분자, 긴 dsRNA 분자 또는 miRNA 분자는 IL-11 또는 IL-11R의 부분 서열을 포함한다.
- [0164] 일 구현예에서, siRNA 분자, 긴 dsRNA 분자 또는 miRNA 분자는 벡터로부터 전사에 의해 (세포 내에서) 내생적으

로 생산된다. 벡터는 당해 분야에 공지된 임의의 방법으로 세포 내로 도입될 수 있다. 선택적으로, RNA 서열의 발현은 조직 특이적(예를 들어, 심장, 간, 신장 또는 눈 특이적) 프로모터를 이용하여 조절될 수 있다. 추가적인 구현예에서, siRNA 분자, 긴 dsRNA 분자 또는 miRNA 분자는 벡터로부터 전사에 의해 (시험관 내에서) 외생적으로 생성된다.

[0165] 적절한 벡터는 IL-11 또는 IL-11R을 억제할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 제제를 발현하도록 구성된 올리고뉴클레오타이드 벡터일 수 있다. 이러한 벡터는 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터일 수 있다. 치료 올리고뉴클레오타이드는 바이러스 벡터의 게놈에 통합되어, 그것의 발현을 유도하는 조절 서열, 예를 들어 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 뉴클레오타이드 서열의 발현이 조절 서열의 영향 또는 제어하에 놓이도록 하는 방식으로, 선택된 뉴클레오타이드 서열과 조절 뉴클레오타이드 서열이 공유적으로 연결되는 상황을 포함할 수 있다. 따라서, 조절 서열이 선택된 뉴클레오타이드 서열의 일부 또는 전부를 형성하는 뉴클레오타이드 서열의 전사에 영향을 줄 수 있다면, 조절 서열은 선택된 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0166] 프로모터 발현된 siRNA 서열을 암호화하는 바이러스 벡터는 당해 분야에 공지되어 있으며, 치료 올리고뉴클레오타이드의 장기적인 발현이라는 이점을 갖는다. 예로는 렌티바이러스(Nature 2009 Jan 22; 457(7228):426-433), 아데노바이러스(Shen et al., FEBS Lett 2003 Mar 27;539(1-3)111-4) 및 레트로바이러스(Barton and Medzhitov PNAS November 12, 2002 vol.99, no.23 14943-14945)가 포함한다.

[0167] 다른 구현예에서, 벡터는 IL-11 또는 IL-11R 발현 억제가 필요한 부위의 치료 올리고뉴클레오타이드의 전달에 도움이 되도록 구성될 수 있다. 이러한 벡터는 전형적으로 올리고뉴클레오타이드와 양으로 하전된 벡터(예를 들어, 양이온성 세포 투과성 펩타이드, 양이온성 중합체 및 덴드리머(dendrimer), 및 양이온성 지질)가 복합체를 형성하는 것; 올리고뉴클레오타이드를 작은 분자(예를 들어, 콜레스테롤, 담즙산 및 지질), 중합체, 항체 및 RNA와 접합시키는 것; 또는 올리고뉴클레오타이드를 나노입자 제형에 캡슐화시키는 것과 관련이 있다(Wang et al., AAPS J. 2010 Dec; 12(4): 492-503).

[0168] 일 구현예에서, 벡터는 센스 및 안티센스 배향으로 핵산 서열을 포함할 수 있어, RNA로서 발현될 때 센스 섹션과 안티센스 섹션이 결합하여 이중 가닥 RNA를 형성할 것이다.

[0169] 대안적으로, siRNA 분자는 당해 분야에 공지된 표준 고체상 또는 용액상 합성 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 뉴클레오타이드 사이의 연결은 포스포디에스테르 결합, 또는 대체물, 예를 들어 화학식 P(O)S, (티오에이트); P(S)S, (디티오에이트); P(O)NR'²; P(O)R'; P(O)OR₆; CO; 또는 CONR'²의 연결 그룹(여기에서, R은 H (또는 염) 또는 알킬 (1-12C)이고, R₆은 알킬 (1-9C)임)이며, -O- 또는 -S-를 통해 인접한 뉴클레오타이드에 연결됨)일 수 있다, .

[0170] 자연 발생적 염기 이외에도 개질된 뉴클레오타이드 염기가 이용될 수 있고, 개질된 뉴클레오타이드 염기는 그것을 함유하는 siRNA 분자에 유리한 특성을 부여할 수 있다.

[0171] 예를 들어, 개질된 염기는 siRNA 분자의 안정성을 증가시켜, 침묵에 필요한 양을 감소시킬 수 있다. 개질된 염기의 제공은 또한 개질되지 않은 siRNA보다 더 안정적인가거나 덜 안정적인 siRNA 분자를 제공할 수 있다.

[0172] 용어 '개질된 뉴클레오타이드 염기(modified nucleotide base)'는 공유적으로 개질된 염기 및/또는 당을 갖는 뉴클레오타이드를 포괄한다. 예를 들어, 개질된 뉴클레오타이드는 3' 위치에 하이드록실 그룹 및 5' 위치에 인산 그룹 외에 저분자량의 유기 그룹에 공유적으로 결합된 당을 가지고 있는 뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 개질된 뉴클레오타이드는 2' 치환 당, 예컨대 2'-O-메틸-; 2'-O-알킬; 2'-O-알릴; 2'-S-알킬; 2'-S-알릴; 2'-플루오로-; 2'-할로 또는 아지도-리보오스, 탄소고리 당 유사체, α-아노머 당; 에피머 당, 예컨대 아라비노오스, 자일로오스 또는 릭소스, 피라노스 당, 퓨라노스 당 및 세도헥톨로오스도 포함할 수 있다.

[0173] 개질된 뉴클레오타이드는 당해 분야에 공지되어 있으며, 알킬화 퓨린 및 피리미딘, 아실화 퓨린 및 피리미딘, 및 기타 헤테로고리를 포함한다. 이들 부류의 피리미딘 및 퓨린은 당해 분야에 공지되어 있으며, 슈도이소시토신, N₄,N₄-에타노시토신, 8-하이드록시-N₆-메틸아데닌, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시하이드록실메틸) 우라실, 5 플루오로우라실, 5-브로로우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸 우라실, 디하이드로우라실, 이노신, N₆-이소펜틸-아데닌, 1- 메틸아데닌, 1-메틸슈도우라실, 1-메틸구아닌, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N₆-메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸 우라실, 5-메톡시 아미노 메틸-2-티오우라실, -D-만노실케오신, 5-메톡시카르보닐메틸우라실, 5메톡시우라실, 2 메틸티오-N₆-이소펜틸아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 슈도우라실, 2-티오시토신, 5-메

틸-2 티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5메틸우라실, N-우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실 5-옥시아세트산, 퀘오신, 2-티오시토신, 5-프로필우라실, 5-프로필시토신, 5-에틸우라실, 5-에틸시토신, 5-부틸우라실, 5-펜틸우라실, 5-펜틸시토신, 및 2,6,디아미노퓨린, 메틸슈도우라실, 1-메틸구아닌, 1-메틸시토신을 포함한다.

- [0174] 예쁜꼬마선충(*C. elegans*), 초파리, 식물 및 포유동물에서 유전자를 침묵시키기 위한 RNAi의 사용과 관련된 방법은 당해 분야에 공지되어 있다(Fire A, et al., 1998 Nature 391:806-811; Fire, A. Trends Genet. 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. RNA interference 2001. Genes Dev. 15, 485-490 (2001); Hammond, S. M., et al., Nature Rev. Genet. 2, 110-1119 (2001); Tuschl, T. Chem. Biochem. 2, 239-245 (2001); Hamilton, A. et al., Science 286, 950-952 (1999); Hammond, S. M., et al., Nature 404, 293-296 (2000); Zamore, P. D., et al., Cell 101, 25-33 (2000); Bernstein, E., et al., Nature 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M., et al., Genes Dev. 15, 188-200 (2001); WO0129058; WO9932619, 및 Elbashir S M, et al., 2001 Nature 411:494-498).
- [0175] 따라서, 본 발명은 IL-11 또는 IL-11R을 달리 발현하는 포유동물, 예를 들어 인간의 세포 내로 적절하게 도입되거나 그 안에서 발현될 때, RNAi에 의해 IL-11 또는 IL-11R 발현을 억제할 수 있는 핵산을 제공한다.
- [0176] 핵산은 GenBank 등록번호 NM_000641.3 GI:391353405(IL-11) 또는 U32324.1 GI:975336(IL-11R)에 정의된 바와 같은 IL-11 또는 IL-11R mRNA의 일부분, 또는 상기 mRNA에 대한 상보적 서열에 대해 실질적인 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0177] 핵산은 이중 가닥 siRNA일 수 있다. (당업자라면 알 수 있듯이, 그리고 아래에서 추가로 설명되는 바와 같이, siRNA 분자는 짧은 3' DNA 서열 또한 포함할 수 있다.)
- [0178] 대안적으로, 핵산은 포유동물 세포에서 전사될 때 스페이서를 통해 결합된 두 개의 상보적 부분을 갖는 RNA를 생성하여, 상보적 부분이 서로 혼성화될 때 RNA가 헤어핀의 형태를 취하는 DNA(대개는 이중 가닥 DNA)일 수 있다. 포유동물 세포에서, 헤어핀 구조는 효소 DICER에 의해 분자로부터 절단되어 두 개의 별개이지만 혼성화된 RNA 분자를 생성할 수 있다.
- [0179] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산은 서열번호 2 내지 5(IL-11; 도 11) 중 하나의 서열에 대해 또는 서열번호 7 내지 10(IL-11R; 도 12) 중 하나에 대해 대체로 표적화된다.
- [0180] mRNA 전사체의 단일 가닥(즉, 비 자가-혼성화된) 영역들만이 RNAi에 대한 적절한 표적이 될 것으로 예상된다. 따라서, 서열번호 2 내지 5 또는 7 내지 10 중 하나로 대표되는 서열에 대해 IL-11 또는 IL-11R mRNA 전사체에서 매우 근접한 다른 서열들 또한 RNAi의 적절한 표적이 될 수 있다고 제안된다. 이러한 표적 서열은 바람직하게는 17-23개의 뉴클레오타이드 길이이고, 바람직하게는 (서열번호 2 내지 5 또는 7 내지 10 중 하나의 어느 한 말단에서) 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 전체 19개의 뉴클레오타이드에 의해 서열번호 2 내지 5 또는 7 내지 10 중 하나가 중첩된다.
- [0181] 따라서, 본 발명은 IL-11 또는 IL-11R을 달리 발현하는 포유동물 세포 내로 적절하게 도입되거나 그 안에서 발현될 때 RNAi에 의해 IL-11 또는 IL-11R 발현을 억제할 수 있는 핵산을 제공하며, 여기에서 핵산은 서열번호 2 내지 5 또는 7 내지 10 중 하나의 서열에 대해 대체로 표적화된다.
- [0182] "대체로 표적화(generally targeted)"됨으로써, 핵산은 서열번호 2 내지 5 또는 7 내지 10과 중첩되는 서열을 표적화할 수 있다. 특히, 핵산은 서열번호 2 내지 5 또는 7 내지 10 중 하나보다 약간 길거나 짧은 (바람직하게는, 17-23개의 뉴클레오타이드 길이), 그러나 그렇지 않으면 서열번호 2 내지 5 또는 7 내지 10 중 하나와 동일한 인간 IL-11 또는 IL-11R의 mRNA 내의 서열을 표적화할 수 있다.
- [0183] 본 발명의 핵산과 표적 서열 사이의 완벽한 동일성/상보성은 바람직하기는 하지만 필수적이지는 않은 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 핵산은 IL-11 또는 IL-11R의 mRNA와 비교하여 단일 미스매치(mismatch)를 포함할 수 있다. 그러나, 단일 미스매치라도 그 존재는 효율 감소로 이어질 가능성이 높으므로, 미스매치가 존재하지 않는 것이 바람직한 것으로 예상된다. 존재할 경우, 미스매치의 수를 고려하여 3' 돌출부가 제외될 수 있다.
- [0184] 용어 "상보성(complementarity)"은 자연 발생적인 리보- 및/또는 데옥시리보뉴클레오타이드로 이루어지는 핵산 사이의 통상적인 염기쌍에 한정되지 않으며, 비 천연 뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명의 핵산과 mRNA 사이의 염기쌍도 포함한다.
- [0185] 일 구현예에서, (본원에서 이중 가닥 siRNA라고 지칭되는) 핵산은 도 13에 도시된 이중 가닥 RNA 서열을 포함한

다(IL-11; 서열번호 11 내지 14).

- [0186] 또 다른 구현예에서, (본원에서 이중 가닥 siRNA라고 지칭되는) 핵산은 도 14에 도시된 이중 가닥 RNA 서열을 포함한다(IL-11R; 서열번호 15 내지 18).
- [0187] 그러나, IL-11 또는 IL-11R mRNA의 동일 영역으로 향하는 약간 짧거나 긴 서열 또한 효과적인 것으로도 예상된다. 특히, 17 내지 23 bp 길이 사이의 이중 가닥 서열 또한 효과적인 것으로 예상된다.
- [0188] 이중 가닥 RNA를 형성하는 가닥은 짧은 3' 디뉴클레오타이드 돌출부를 가질 수 있으며, 이는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 3' DNA 돌출부의 사용은 3' RNA 돌출부와 비교하여 siRNA 활성화에 어떠한 영향도 미치지 않으나, 핵산 가닥의 화학적 합성 비용을 감소시킨다(Elbashir et al., 2001c). 이러한 이유로, DNA 디뉴클레오타이드가 바람직할 수 있다.
- [0189] 존재한다면, 디뉴클레오타이드 돌출부는 서로에 대해 대칭일 수 있지만, 이것이 필수적인 것은 아니다. 실제로, 센스(상부) 가닥의 3' 돌출부는 mRNA 인식 및 분해에 참여하지 않으므로 RNAi 활성화는 무관하다(Elbashir et al., 2001a, 2001b, 2001c).
- [0190] 초파리에서의 RNAi 실험이 안티센스 3' 돌출부가 mRNA 인식 및 표적화에 참여할 수 있음을 보여주는데 반하여(Elbashir et al. 2001c), 3' 돌출부는 포유동물 세포에서 siRNA의 RNAi 활성화에는 필수적이지 않은 것으로 보인다. 따라서, 3' 돌출부의 부정확한 어닐링은 포유동물 세포에서 거의 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다(Elbashir et al. 2001c; Czauderna et al. 2003).
- [0191] 따라서, 임의의 디뉴클레오타이드 돌출부는 siRNA의 안티센스 가닥에 이용될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 디뉴클레오타이드는 바람직하게는 -UU 또는 -UG(또는 돌출부가 DNA인 경우 -TT 또는 -TG), 더욱 바람직하게는 -UU(또는 -TT)이다. -UU(또는 -TT) 디뉴클레오타이드 돌출부가 가장 효과적이며, 이는 전사 신호(종결자 신호는 TTTT임)의 RNA 중합효소 III 말단과 일치한다(즉, 전사 신호의 RNA 중합효소 III 말단의 일부분을 형성할 수 있다). 따라서, 이 디뉴클레오타이드가 가장 바람직하다. 디뉴클레오타이드 AA, CC 및 GG도 이용될 수 있지만, 덜 효과적이며, 결과적으로 덜 바람직하다.
- [0192] 나아가, 3' 돌출부는 siRNA로부터 완전히 생략될 수 있다.
- [0193] 본 발명은 또한 바람직하게는, 3' 돌출부가 있지만 선택적으로는 없는, 전술한 이중 가닥 핵산 중 하나의 구성 가닥(component strand)으로 이루어지는 (본원에서는 단일 가닥 siRNA라 지칭되는) 각각의 단일 가닥 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 시험관 내에서 서로 혼성화되어 전술한 이중 가닥 siRNA를 형성할 수 있고, 그런 다음 세포 내로 도입될 수 있는 이러한 단일 가닥 핵산의 쌍을 함유하는 키트를 제공한다.
- [0194] 또한, 본 발명은 포유동물 세포에서 전사될 때, 예를 들어 서열번호 11 내지 14 또는 15 내지 18로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열 또는 단일 염기 쌍 치환에 의해 전술한 서열 중 임의의 하나와 상이한 서열을 포함하는, 이중 가닥 모티프를 생성하기 위해 자가 혼성화할 수 있는 두 개의 상보적인 부분을 가지는 (본원에서는 shRNA라고도 지칭되는) RNA를 생산하는 DNA를 제공한다.
- [0195] 상보적 부분은 일반적으로 스페이서에 의해 연결될 것이며, 스페이서는 두 개의 상보적 부분이 서로 혼성화될 수 있도록 적절한 길이와 서열을 갖는다. 두 개의 상보적(즉, 센스 및 안티센스) 부분은 어느 하나의 순서로도 5'-3'에 연결될 수 있다. 스페이서는 전형적으로 대략 4-12개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 4-9개 뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 6-9개 뉴클레오타이드의 짧은 서열일 것이다.
- [0196] 바람직하게는, 스페이서의 5' 말단(상류의 상보적 부분의 바로 3')은 뉴클레오타이드 -UU- 또는 -UG-, 다시 바람직하게는 -UU-로 이루어진다(그러나 다시, 이러한 특정 디뉴클레오타이드의 사용은 필수적이지 않음). 올리고엔진(OligoEngine, 미국 워싱턴 주 시애틀)의 pSuper 시스템에서의 사용을 위해 추천된 적절한 스페이서는 UUCAAGAGA이다. 이 경우 및 다른 경우에서, 스페이서의 말단은 서로 혼성화될 수 있고, 예를 들어 적은 수(예를 들어, 1 또는 2개)의 염기 쌍에 의해 서열번호 11 내지 14 또는 15 내지 18의 정확한 서열을 넘어서 이중 가닥 모티프를 연장시킨다.
- [0197] 유사하게는, 전사된 RNA는 바람직하게는 하류의 상보적 부분으로부터 3' 돌출부를 포함한다. 다시, 이것은 바람직하게는 -UU 또는 -UG, 더욱 바람직하게는 -UU이다.
- [0198] 그런 다음, 이러한 shRNA 분자는 효소 DICER에 의해 포유동물 세포에서 절단되어 상기 기술된 바와 같이 이중 가닥 siRNA를 생산할 수 있으며, 여기에서 혼성화된 dsRNA의 한 가닥 또는 각각의 가닥은 3' 돌출부를

포함한다.

- [0199] 본 발명의 핵산의 합성 기술은 당연히 당해 분야에 잘 알려져 있다.
- [0200] 당업자는 잘 알려져 있는 기술 및 상업적으로 이용 가능한 물질을 이용하여 본 발명의 DNA를 위한 적절한 전사 벡터를 잘 구축할 수 있다. 특히, DNA는 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함하는 조절 서열과 결합될 것이다.
- [0201] 상업적으로 이용 가능한 올리고엔진(OligoEngine, 미국 워싱턴 주 시애틀)의 pSuper 및 pSuperior 시스템이 특히 적합하다. 이것들은 중합효소-III 프로모터(H1)와 전사체의 3' 말단에서 두 개의 U 잔기를 제공하는 T₅ 전사 종결자 서열(이것은 DICER 프로세싱 후에 siRNA의 한 가닥의 3' UU 돌출부를 제공한다)을 이용한다.
- [0202] 또 다른 적절한 시스템은 문헌[Shin et al. (RNA, 2009 May; 15(5):898-910)]에 기술되어 있는데, 이것은 또 다른 중합효소-III 프로모터(U6)를 이용한다.
- [0203] 본 발명의 이중 가닥 siRNA는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 억제하기 위해, 아래에 기술된 바와 같이, 공지된 기술을 이용하여 시험관 내에서 또는 생체 내에서 포유동물 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0204] 유사하게는, 본 발명의 DNA를 함유하는 전사 벡터는 다시 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 억제하기 위해, 일시적 또는 안정적인 RNA 발현을 위한 아래 기술된 바와 같이 공지된 기술을 이용하여 시험관 내에서 또는 생체 내에서 종양 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0205] 따라서, 본 발명은 포유동물, 예를 들어 인간 세포에서 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 억제하는 방법으로서, 본 발명의 이중 가닥 siRNA 또는 본 발명의 전사 벡터를 세포에 투여하는 단계를 포함하는 방법도 제공한다.
- [0206] 유사하게는, 본 발명은 섬유증 치료 방법을 더 제공하며, 방법은 본 발명의 이중 가닥 siRNA 또는 본 발명의 전사 벡터를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0207] 본 발명은 또한 치료 방법, 바람직하게는 섬유증의 치료 방법에 사용하기 위한, 본 발명의 이중 가닥 siRNA 및 본 발명의 전사 벡터를 제공한다.
- [0208] 또한, 본 발명은 섬유증 치료를 위한 의약의 제조에 있어서, 본 발명의 이중 가닥 siRNA 및 본 발명의 전사 벡터의 용도를 제공한다.
- [0209] 또한, 본 발명은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합한 본 발명의 이중 가닥 siRNA 또는 본 발명의 전사 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다. 적합한 담체는 친유성 담체 또는 소포체(vesicle)를 포함하며, 이들은 세포막 투과를 보조할 수 있다.
- [0210] 본 발명의 siRNA 듀플렉스(duplex) 및 본 발명의 DNA 벡터의 투여에 적합한 물질 및 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있고, RNAi 기술의 잠재성을 고려할 때, 개선된 방법이 개발 중에 있다.
- [0211] 일반적으로, 포유동물 세포에 핵산을 도입하기 위한 여러 가지 기술들이 이용 가능하다. 기술의 선택은 핵산이 환자의 세포에서 시험관 내 또는 생체 내에서 배양된 세포 내로 전달되는지에 따라 달라질 것이다. 시험관 내에서 포유동물 세포 내로 핵산을 전달하기에 적합한 기술은 리포솜의 사용, 전기천공법, 미세주입법, 세포융합법, DEAE 텍스트란 및 인산칼슘 침전법을 포함한다. 생체 내 유전자 전달 기술은 바이러스 (전형적으로는, 레트로바이러스) 벡터를 이용한 형질감염 및 바이러스 피막 단백질-리포솜 매개성 형질감염을 포함한다(Dzau et al. (2003) Trends in Biotechnology 11, 205-210).
- [0212] 특히, 시험관 내 및 생체 내에서 본 발명의 핵산의 세포적 투여(cellular administration)를 위한 적절한 방법은 다음 논문에 개시되어 있다:
- [0213] 전반적인 검토: Borkhardt, A. 2002. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment? Cancer Cell. 2:167-8. Hannon, G.J. 2002. RNA interference. Nature. 418:244-51. McManus, M.T., and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet. 3:737-47. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder. 2003b. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. Curr Med Chem. 10:245-56. Shuey, D.J., D.E. McCallus, and T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. Drug Discov Today. 7:1040-6.
- [0214] 리포솜을 이용한 전신적 전달: Lewis, D.L., J.E. Hagstrom, A.G. Loomis, J.A. Wolff, and H. Herweijer. 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. Nat Genet.

32:107-8. Paul, C.P., P.D. Good, I. Winer, and D.R. Engelke. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol.* 20:505-8. Song, E., S.K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar, and J. Lieberman. 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.* 9:347-51. Sorensen, D.R., M. Leirdal, and M. Sioud. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol.* 327:761-6.

[0215] 바이러스 매개성 전달: Abbas-Terki, T., W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralong, and P. Aebischer. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther.* 13:2197-201. Barton, G.M., and R. Medzhitov. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14943-5. Devroe, E., and P.A. Silver. 2002. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol.* 2:15. Lori, F., P. Guallini, L. Galluzzi, and J. Lisiewicz. 2002. Gene therapy approaches to HIV infection. *Am J Pharmacogenomics.* 2:245-52. Matta, H., B. Hozayev, R. Tomar, P. Chugh, and P.M. Chaudhary. 2003. Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. *Cancer Biol Ther.* 2:206-10. Qin, X.F., D.S. An, I.S. Chen, and D. Baltimore. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:183-8. Scherr, M., K. Battmer, A. Ganser, and M. Eder. 2003a. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle.* 2:251-7. Shen, C., A.K. Buck, X. Liu, M. Winkler, and S.N. Reske. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett.* 539:111-4.

[0216] 펩타이드 전달: Morris, M.C., L. Chaloin, F. Heitz, and G. Divita. 2000. Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 11:461-6. Simeoni, F., M.C. Morris, F. Heitz, and G. Divita. 2003. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31:2717-24. 표적 세포로의 siRNA의 전달에 적합할 수 있는 기타 기술은 미국 특허 제6,649,192B호 및 제5,843,509B호에 기술된 것과 같은 나노 입자 또는 나노 캡슐을 기초로 한다.

[0217] **제형**

[0218] 치료적 적용에서, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제, 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제는 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 부형제, 희석제, 충전제, 완충제, 보존제, 항산화제, 운환제, 안정화제, 가용화제, 계면활성제(예를 들어, 습윤제), 마스킹제, 착색제, 향미제 및 감미제를 포함하나 이에 한정되지 않는, 당업자에게 잘 알려져 있는 하나 이상의 다른 약학적으로 허용 가능한 성분들과 함께 의약 또는 약제로서 제형화된다.

[0219] 본 설명에 사용된 용어 "약학적으로 허용 가능한(pharmaceutically acceptable)"은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 합당한 이익/위험 비율에 상응하는 과도한 독성, 자극, 알레르기성 반응, 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 문제의 대상체(예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 성분, 물질, 조성물, 투여 형태 등에 관한 것이다. 각각의 담체, 보조제, 부형제 등은 제형의 다른 성분들과 혼화 가능하다는 점에서도 "허용 가능" 해야 한다.

[0220] 적합한 담체, 보조제, 부형제 등은 일반적인 약학 교재, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; 및 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994에서 찾아볼 수 있다.

[0221] 제형은 약학 분야에 잘 알려져 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 활성 화합물을 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 화합물을 담체(예를 들어, 액체 담체, 미세하게 분할된 고체 담체 등)와 균일하고 친밀하게 결합시킨 다음, 필요한 경우 생성물을 성형함으로써 제조된다.

[0222] 제형은 주사를 포함할 수 있는, 국소, 비경구, 전신, 정맥 내, 동맥 내, 근육 내, 경막 내, 안구 내, 결막 내, 피하, 경구 또는 경피 투여 경로를 위해 제조될 수 있다. 주사 가능한 제형은 멸균 또는 등장성 매질 중에 선택된 제제를 포함할 수 있다.

[0223] 투여는 바람직하게는 "치료학적 유효량(therapeutically effective amount)"으로 되며, 이것은 개체에 이익을 나타내기에 충분하다. 실제 투여되는 양, 그리고 투여 속도 및 투여 시간 경과에 치료되는 질병의 특성 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 치료의 처방, 예를 들어 복용량의 결정 등은 일반의 및 기타 의사의 책임하에

있으며, 전형적으로 치료되는 장애, 개별 환자의 상태, 전달 부위, 투여 방법 및 의사에게 알려져 있는 기타 요인들을 고려한다. 위에 언급된 기술 및 프로토콜의 예는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins]에서 찾아볼 수 있다.

[0224] 섬유증

[0225] 본원에 사용된 "섬유증(fibrosis)"은 세포 외 매트릭스 성분, 예를 들어 콜라겐의 과도한 침착의 결과로서 과도한 섬유성 결합조직의 형성을 말한다.

[0226] 섬유성 결합조직은 높은 콜라겐 함량의 세포 외 매트릭스(extracellular matrix, ECM)을 갖는 것을 특징으로 한다. 콜라겐은 불규칙하게 배열되거나 정렬될 수 있는 가닥 또는 섬유에 제공될 수 있다. 섬유성 결합조직의 ECM은 글리코사미노글리칸을 포함할 수도 있다.

[0227] 본원에 사용된 "과도한 섬유성 결합조직(excess fibrous connective tissue)"은 예를 들어, 정상적인 비 병리학 조건하에서, 섬유증의 부재하의 그 위치에 존재하는 결합조직의 양보다 많은, 주어진 위치(예를 들어, 주어진 조직 또는 기관, 또는 주어진 조직 또는 기관의 일부분)에서의 결합조직의 양을 말한다. 본원에 사용된 "세포 외 매트릭스 성분"의 과도한 침착(excess deposition of extracellular matrix component)"은 예를 들어, 정상적인 비 병리학 조건하에서, 섬유증 부재하의 침착의 수준보다 높은, 하나 이상의 세포 외 매트릭스 성분의 침착 수준을 말한다.

[0228] 섬유증의 세포적 메커니즘 및 분자적 메커니즘은 본 설명에 전체가 참조로 포함되는 문헌[Wynn, J. Pathol. (2008) 214(2): 199-210, and Wynn and Ramalingam, Nature Medicine (2012) 18:1028-1040]에 기술되어 있다.

[0229] 섬유증의 주요한 세포 작동체(effector)는 근섬유아세포이며, 이것은 콜라겐이 풍부한 세포 외 매트릭스를 생산한다.

[0230] 조직 손상에 대응하여, 손상된 세포와 백혈구는 TGF β , IL-13 및 PDGF와 같은 섬유증 촉진 인자를 생산하며, 이것들은 섬유아세포를 α SMA 발현 근섬유아세포로 활성화시키고 근섬유아세포를 손상 부위로 동원한다. 근섬유아세포는 다량의 세포 외 매트릭스를 생산하며, 상처의 구축 및 봉합을 돕는 데 있어서 중요한 매개자이다. 그러나, 지속적인 감염 상태하에서 또는 만성 염증 중에는 근섬유아세포의 과도한 활성화 및 동원이 있을 수 있으므로, 세포 외 매트릭스 성분의 과잉 생산이 일어날 수 있어 과도한 섬유성 결합조직의 형성이 초래될 수 있다.

[0231] 일부 구현예에서, 섬유증은 병리학 조건, 예를 들어 TGF β 1과 같은 섬유증 촉진 인자의 생산을 유발하는 상태, 감염 또는 질병 상태에 의해 촉발될 수 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 물리적 손상/자극, 화학적 손상/자극 또는 환경적 손상/자극에 의해 유발될 수 있다. 물리적 손상/자극은 수술 중에, 예를 들어 의원성 원인(iatrogenic cause)으로 발생할 수 있다. 화학적 손상/자극은 예를 들어, 블레오마이신, 시클로포스파미드, 아미오다론, 프로카인아미드, 페니실라민, 금 및 니트로푸란토인과 같은 약물의 만성 투여(Daba et al., Saudi Med J 2004 Jun; 25(6): 700-6)에 따른 약물 유도성 섬유증을 포함할 수 있다. 환경적 손상/자극은 석면 섬유 또는 실리카에 대한 노출을 포함할 수 있다.

[0232] 섬유증은 신체의 여러 조직에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 섬유증은 간(예를 들어, 간경화), 폐, 신장, 심장, 혈관, 눈, 피부, 췌장, 장, 뇌 및 골수에서 발생할 수 있다. 섬유증은 동시에 여러 기관에서 발생할 수도 있다.

[0233] 본원의 구현예에서, 섬유증은 위장관계의 기관, 예를 들어 간, 소장, 대장, 또는 췌장에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 호흡계의 기관, 예를 들어 폐에 영향을 미칠 수 있다. 구현예에서, 섬유증은 심혈관계의 기관, 예를 들어 심장 또는 혈관에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 피부에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 신경계의 기관, 예를 들어 뇌에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 비뇨기계의 기관, 예를 들어 신장에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 근골격계의 기관, 예를 들어 근육 조직에 영향을 미칠 수 있다.

[0234] 일부 바람직한 구현예에서, 섬유증은 심장 또는 심근 섬유증, 간 섬유증, 또는 신장 섬유증이다. 일부 구현예에서, 심장 또는 심근 섬유증은 심장의 근육계 또는 전기적 특성의 기능 장애, 또는 심장 판막 벽의 비후와 관련이 있다. 일부 구현예에서, 섬유증은 심장의 심방 및/또는 심실의 섬유증이다. 심방 또는 심실 섬유증의 치료 또는 예방은 심방 세동, 심실 세동, 또는 심근 경색의 위험 또는 발병을 감소시키는 데 도움을 줄 수 있다.

[0235] 일부 바람직한 구현예에서, 간 섬유증은 만성 간 질환 또는 간 경화증과 관련이 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 신장 섬유증은 만성 신장 질환과 관련이 있다.

- [0236] 본 발명에 따른 섬유증을 특징으로 하는 질병/질환은 호흡계 질환, 예컨대 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 낭성 섬유증(cystic fibrosis), 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 진행성 거대 섬유증(progressive massive fibrosis), 피부 경화증(scleroderma), 폐쇄성 세기관지염(obstructive bronchiolitis), 헤르만스키-푸들라크 증후군(Hermansky-Pudlak syndrome), 석면증(asbestosis), 규폐증(silicosis), 만성 폐 고혈압(chronic pulmonary hypertension), AIDS 관련 폐 고혈압(AIDS associated pulmonary hypertension), 사르코이드증(sarcoidosis), 폐 질병에서의 종양 간질(tumor stroma), 및 천식(asthma); 만성 간 질환(chronic liver disease), 원발성 담즙성 간경화증(primary biliary cirrhosis, PBC), 주혈흡충성 간 질병(schistosomal liver disease), 간 경화증(liver cirrhosis); 심혈관성 질환, 예컨대 비대성 심근증(hypertrophic cardiomyopathy), 확장성 심근병증(dilated cardiomyopathy, DCM), 심방 섬유증(fibrosis of the atrium), 심방 세동(atrial fibrillation), 심실 섬유증(fibrosis of the ventricle), 심실 세동(ventricular fibrillation), 심근 섬유증(myocardial fibrosis), 브루가다 증후군(Brugada syndrome), 심근염(myocarditis), 심내막심근 섬유증(endomyocardial fibrosis), 심근경색(myocardial infarction), 섬유증성 혈관병(fibrotic vascular disease), 고혈압성 심장병(hypertensive heart disease), 부정맥성 우심실 심근병증(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC), 요세관 간질성 및 사구체성 섬유증(tubulointerstitial and glomerular fibrosis), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 정맥류(varicose veins), 대뇌경색(cerebral infarcts); 신경성 질환, 예컨대 신경아교증(gliosis) 및 알츠하이머병(Alzheimer's disease); 근이영양증(muscular dystrophy), 예컨대 듀켄씨 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy, DMD) 또는 베커 근이영양증(Becker's muscular dystrophy, BMD); 위장관 질환, 예컨대 크론병(Chron's disease), 미세장염(microscopic colitis) 및 원발 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis, PSC); 피부 질환, 예컨대 피부 경화증(scleroderma), 신성 전신 섬유증(nephrogenic systemic fibrosis) 및 피부 켈로이드(cutis keloid); 관절섬유증(arthrofibrosis); 듀프이트렌 구축(Dupuytren's contracture); 종격 섬유증(mediastinal fibrosis); 후복막 섬유증(retroperitoneal fibrosis); 골수 섬유증(myelofibrosis); 페이로니병(Peyronie's disease); 유착성 관절낭염(adhesive capsulitis); 신장 질환(예를 들어, 신장 섬유증(renal fibrosis), 신염 증후군(nephritic syndrome), 알포트 증후군(Alport's syndrome), HIV 관련 신증(HIV associated nephropathy), 다낭성 신장 질환(polycystic kidney disease), 파브리병(Fabry's disease), 당뇨병성 신장증(diabetic nephropathy), 만성 사구체신염(chronic glomerulonephritis), 전신 루푸스 관련 신염(nephritis associated with systemic lupus)); 진행성 전신 경화증(progressive systemic sclerosis, PSS); 만성 이식편 대숙주병(chronic graft versus host disease); 눈 질환, 예컨대 그레이브스 안병증(Grave's ophthalmopathy), 망막바깥 섬유증(epiretinal fibrosis), 망막 섬유증(retinal fibrosis), 망막하 섬유증(subretinal fibrosis)(예를 들어, 황반 변성(예를 들어, 습윤성 노인 황반 변성(wet age-related macular degeneration, AMD))과 관련된 망막하 섬유증), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 녹내장(glaucoma), 각막 섬유증(corneal fibrosis), 수술 후 섬유증(post-surgical fibrosis)(예를 들어, 백내장(cataract) 수술 후 후낭(posterior capsule), 또는 녹내장 섬유주절제(trabeculectomy) 후 수포(bleb)의 수술 후 섬유증), 결막 섬유증(conjunctival fibrosis), 결막하 섬유증(subconjunctival fibrosis); 관절염(arthritis); 섬유증성 종양전 질병 및 섬유증성 종양 질병; 및 화학적 또는 환경적 상해(insult)(예를 들어, 암 화학요법, 살충제, 방사선/암 방사선치료)에 의해 유발된 섬유증을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0237] 상기 열거된 질병/질환 중 많은 것들이 서로 관련이 있음을 알 것이다. 예를 들어, 심실의 섬유증은 심근 경색 후에 발생할 수 있고, DCM, HCM 및 심장근육염과 관련이 있다.
- [0238] 특정 구현예에서, 질병/장애는 폐 섬유증, 심방 세동, 심실 세동, 비대성 심근증(HCM), 확장성 심근증(DCM), 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 간경화증, 만성 신장 질환, 피부 경화증, 전신 경화증, 켈로이드, 낭성 섬유증, 크론병, 수술 후 섬유증 또는 망막 섬유증 중 하나일 수 있다.
- [0239] 본 발명에 따른 섬유증의 치료, 예방 또는 경감은 IL-11의 상향 조절, 예를 들어 섬유증이 일어나거나 일어날 수 있는 세포 또는 조직에서의 IL-11의 상향 조절, 또는 세포 외 IL-11 또는 IL-11R의 상향 조절과 관련된 섬유증의 치료, 예방 또는 경감일 수 있다.
- [0240] 섬유증의 치료 또는 경감은 섬유증의 진행 예방, 예를 들어 상태의 악화 예방 또는 섬유증 발병의 속도 둔화에 효과적일 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 또는 경감은 섬유증의 개선, 예를 들어 침착된 콜라겐 섬유의 양의 감소를 야기할 수 있다.
- [0241] 섬유증의 예방은 상태 악화의 예방 또는 섬유증 발달의 예방, 예를 들어 초기 단계 섬유증이 후기, 만성 단계로

발달하는 것을 예방함을 지칭할 수 있다.

[0242] **대상체**

[0243] 치료되는 대상체는 임의의 동물 또는 인간일 수 있다. 대상체는 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간이다. 대상체는 비 인간 포유동물일 수 있지만, 더욱 바람직하게는 인간이다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있다. 대상체는 환자일 수 있다.

[0244] **샘플**

[0245] 대상체로부터 수득된 샘플은 임의의 종류일 수 있다. 생물학적 샘플은 임의의 조직 또는 체액, 예를 들어 혈액 샘플, 혈액 유래 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플, 정액 샘플, 타액 샘플, 활액 샘플로부터 채취될 수 있다. 혈액 유래 샘플은 환자의 혈액의 선택된 분획, 예를 들어 선택된 세포를 함유하는 분획 또는 혈장 또는 혈청 분획일 수 있다. 샘플은 조직 샘플 또는 생검; 또는 대상체로부터 단리된 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 생검 또는 바늘 흡인과 같은 공지된 기술에 의해 수집될 수 있다. 샘플은 이후 IL-11 발현 수준의 결정을 위해 보관 및/또는 처리될 수 있다.

[0246] 샘플은 샘플이 채취된 대상체에서의 IL-11 또는 IL-11R의 상향 조절을 결정하는 데 이용될 수 있다.

[0247] 일부 바람직한 구현예에서, 샘플은 심장, 간 또는 신장 조직으로부터 채취된 조직 샘플, 예를 들어 생검일 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플은 눈으로부터 채취된 조직 샘플, 예를 들어 생검일 수 있다.

[0248] 샘플은 세포를 함유할 수 있고, 바람직하게는 섬유아세포 및/또는 근섬유아세포를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 섬유아세포 또는 근섬유아세포는 심장, 간 또는 신장 조직으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 그것들은 심장 섬유아세포 또는 심장 근섬유아세포(예를 들어, Colby et al., Circulation Research 2009;105:1164-1176 참조), 간 섬유아세포 또는 간 근섬유아세포(예를 들어, Zeisberg et al., The Journal of Biological Chemistry, August 10, 2007, 282, 23337-23347; Brenner., Fibrogenesis & Tissue Repair 2012, 5(Suppl 1):S17 참조) 또는 신장 섬유아세포 또는 신장 근섬유아세포(예를 들어, Strutz and Zeisberg. JASN November 2006 vol. 17 no. 11 2992-2998 참조)일 수 있다. 일부 구현예에서, 섬유아세포 또는 근섬유아세포는 눈 조직으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 그것들은 각막 섬유아세포일 수 있다.

[0249] **IL-11 또는 IL-11R 발현의 상향 조절**

[0250] 본 발명의 일부 양태 및 구현예는 예를 들어, 대상체로부터 수득된 샘플에서 IL-11 또는 IL-11R의 발현의 검출에 관한 것이다.

[0251] 일부 양태 및 구현예에서, 본 발명은 (단백질 또는 각각의 IL-11 또는 IL-11R을 암호화하는 올리고뉴클레오타이드로서) IL-11 또는 IL-11R의 발현(과발현)의 상향 조절 및 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제, 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 치료의 적합성의 지표로서 이러한 상향 조절의 검출에 관한 것이다.

[0252] IL-11 또는 IL-11R 발현의 상향 조절은 주어진 유형의 세포 또는 조직에 대해 정상적으로 예상되는 수준보다 높은 수준의 IL-11 또는 IL-11R 발현을 포함한다. 상향 조절은 세포 또는 조직에서 IL-11 또는 IL-11R의 발현 수준을 결정함으로써 결정할 수 있다. 대상체로부터의 세포 또는 조직 샘플에서의 IL-11 또는 IL-11R 발현 수준과 IL-11 또는 IL-11R의 참고(reference) 수준, 예를 들어 동일하거나 상응하는 세포 또는 조직 유형에 대한 IL-11 또는 IL-11R의 정상적인 발현 수준을 나타내는 값 또는 값의 범위 사이에서 비교가 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 수준은 예를 들어, 건강한 대상체로부터의 상응하는 세포 또는 조직 또는 동일한 대상체의 건강한 조직으로부터의 대조군 샘플에서 IL-11 또는 IL-11R 발현을 검출하여 결정할 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 수준은 표준 곡선 또는 데이터 세트로부터 획득될 수 있다.

[0253] 발현 수준은 절대적인 비교를 위해 정량화될 수 있거나, 상대적인 비교가 이루어질 수 있다.

[0254] 일부 구현예에서, IL-11 또는 IL-11R의 상향 조절은 시험 샘플에서의 발현 수준이 참조 수준의 발현 수준의 적어도 1.1배일 때 존재한다고 생각될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 발현 수준은 참조 수준의 발현 수준의 적어도 1.2, 적어도 1.3, 적어도 1.4, 적어도 1.5, 적어도 1.6, 적어도 1.7, 적어도 1.8, 적어도 1.9, 적어도 2.0, 적어도 2.1, 적어도 2.2, 적어도 2.3, 적어도 2.4 적어도 2.5, 적어도 2.6, 적어도 2.7, 적어도 2.8, 적어도 2.9, 적어도 3.0, 적어도 3.5, 적어도 4.0, 적어도 5.0, 적어도 6.0, 적어도 7.0, 적어도 8.0, 적어도 9.0, 또는 적어도 10.0배 중 하나로부터 선택될 수 있다.

- [0255] IL-11 또는 IL-11R 수준은 PCR 기반 검정법, 인 시추(in situ) 혼성화 검정법, 유세포 검정법, 면역학적 또는 면역조직화학적 검정법과 같은, 다수의 공지된 시험관 내 분석 기술 중 하나에 의해 결정될 수 있다.
- [0256] 한 예로써, 적절한 기술은 샘플을 IL-11 또는 IL-11R과 결합할 수 있는 제제와 접촉시키고, 제제와 IL-11 또는 IL-11R의 복합체 형성을 검출함으로써, 샘플에서 IL-11 또는 IL-11R의 수준을 검출하는 방법을 포함한다. 제제는 임의의 적절한 결합 분자, 예를 들어 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 압타머 또는 소분자일 수 있고, 선택적으로 검출을 가능하게 하기 위해, 예를 들어 형성된 복합체의 시각화를 위해 표지될 수 있다. 적절한 표지 및 그것들의 검출 수단은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 형광 표지(예를 들어, 플루오레세인, 로다민, 에오신 및 NDB, 녹색 형광 단백질(GFP), 유토포(Eu), 테르븀(Tb) 및 사마륨(Sm)과 같은 희토류의 킬레이트 화합물, 테트라메틸 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 4-메틸 엄벨리페론, 7-아미노-4-메틸 쿠마린, Cy3, Cy5), 동위원소 마커, 방사성 동위원소(예를 들어, ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S), 화학발광 표지(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀, 이소루미놀), 효소(예를 들어, 과산화효소, 알칼리 인산가수분해효소, 글루코스 산화효소, 베타-갈락토시다제, 루시페라제), 항체, 리간드 및 수용체를 포함한다. 검출 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 표지제와 부합하도록 선택될 수 있다. 적절한 기술은 올리고뉴클레오타이드 태그의 PCR 증폭, 질량 분광검정법, 예를 들어 리포터 단백질에 의한 매트릭스의 효소적 전환 시, 형광 또는 색 검출, 또는 방사능 검출이 포함한다.
- [0257] 검정법은 샘플에서 IL-11 또는 IL-11R의 양을 정량화하도록 구성될 수 있다. 시험 샘플로부터 IL-11 또는 IL-11R의 정량화된 양을 참조 값과 비교할 수 있으며, 비교는 선택된 통계적 유의성의 정도로 시험 샘플이 참조 값보다 높거나 낮은 IL-11 또는 IL-11R의 양을 함유하는지를 결정하는 데 이용될 수 있다.
- [0258] 검출된 IL-11 또는 IL-11R의 정량화는 IL-11 또는 IL-11R을 암호화하는 유전자의 상향 조절 또는 하향 조절 또는 증폭을 결정하는 데 이용될 수 있다. 시험 샘플이 섬유증 세포를 함유하는 경우, 이러한 상향 조절, 하향 조절 또는 증폭은 임의의 통계적 유의차의 존재 여부를 결정하기 위하여 참조 값과 비교될 수 있다.
- [0259] **대상체 선택**
- [0260] 대상체가 상향 조절된 수준의 IL-11 또는 IL-11R 발현을 나타낸다는 결정을 기반으로 치료를 위한 대상체가 선택될 수 있다. 따라서, IL-11 또는 IL-11R은 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 치료에 적합한 섬유증의 마커로서 작용할 수 있다.
- [0261] 상향 조절은 주어진 조직 내에서 또는 주어진 조직으로부터 선택된 세포 내에 존재할 수 있다. 바람직한 조직은 심장, 간 또는 신장 중 하나일 수 있다. 바람직한 조직은 눈일 수 있다. 바람직한 세포 유형은 섬유아세포 또는 근섬유아세포일 수 있다. 상향 조절은 또한 순환하는 체액, 예를 들어 혈액에서, 또는 혈액 유래 샘플에서도 결정될 수 있다. 상향 조절은 세포 외 IL-11 또는 IL-11R의 상향 조절일 수 있다.
- [0262] IL-11 또는 IL-11R 수준의 결정은 본원에 기술된 바와 같이, 대상체로부터 획득된 샘플 상에서 검정법에 의해, 바람직하게는 시험관 내에서 수행될 수 있다.
- [0263] 선택 후, 대상체는 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제의 투여에 의한 섬유증 치료를 받을 수 있다.
- [0264] 일부 구현예에서, 대상체는 섬유증으로 진단되었거나 섬유증을 앓고 있는 것으로 의심되거나 섬유증 발병 위험이 있는 것으로 간주될 수 있고, 대상체가 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 치료로부터 이익을 얻을 것인지의 여부에 관심이 있다. 이러한 구현예에서, 이러한 치료에 대한 대상체의 적합성은 IL-11 또는 IL-11R 발현이 대상체에서 상향 조절되는지를 결정함으로써 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, IL-11 또는 IL-11R 발현은 대상체에서 국소적으로 또는 전체적으로 상향 조절된다.
- [0265] **진단 및 예후**
- [0266] IL-11 또는 IL-11R 발현의 상향 조절의 검출은 대상체에서 섬유증 또는 섬유증 발병 위험을 진단하는 방법 및 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 치료에 대한 대상체의 반응을 예상(prognosing)하거나 예측(predicting)하는 방법에도 이용될 수 있다.
- [0267] 일부 구현예에서, 대상체는 예를 들어, 대상체의 신체에서 또는 대상체 신체의 선택된 세포/조직에서 섬유증을 나타내는 기타 증상의 존재에 기초하여, 섬유증을 앓고 있는 것으로 의심될 수 있거나, 예를 들어 유전적 소인 또는 식면 섬유와 같은 환경적 조건에 대한 노출 때문에 섬유증 발병의 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다.

- [0268] IL-11 또는 IL-11R의 상향 조절의 결정은 섬유증의 진단 또는 섬유증 의심 진단을 확정할 수 있거나 대상체가 섬유증 발병의 위험이 있음을 확정할 수 있다. 또한, 결정은 조건(condition) 또는 소인(predisposition)이 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 치료에 적합한 것이라 진단할 수 있다.
- [0269] 이와 같이, 섬유증을 앓고 있는 대상체 또는 섬유증을 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체의 예후 제공 방법이 제공될 수 있고, 방법은 대상체로부터 수득된 샘플에서 IL-11 또는 IL-11R이 상향 조절되는지를 결정하는 단계, 및 이 결정을 기초로 하여, IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 대상체 치료에 대한 예후를 제공하는 단계를 포함한다.
- [0270] 일부 양태에서, 진단 방법 또는 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 치료에 대한 대상체의 반응을 예지하거나 예측하는 방법은 IL-11 또는 IL-11R 수준의 결정을 필요로 하지 않을 수 있지만, IL-11 또는 IL-11R 발현의 상향 조절 또는 IL-11 또는 IL-11R 활성의 상향 조절을 예측하는 대상체의 유전적 요인의 결정을 기초로 할 수 있다. 이러한 유전적 요인은 IL-11 또는 IL-11R 발현 또는 활성 또는 IL-11 매개성 신호 전달 활성의 상향 조절과 관련이 있고/있거나 이를 예측하는 IL-11 및/또는 IL-11R의 유전학적 돌연변이, 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 또는 유전자 증폭을 포함할 수 있다. 질병 상태에 대한 소인 또는 치료에 대한 반응을 예측하는 데 유전적 요인을 이용하는 것은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Peter Starkel *Gut* 2008;57:440-442; Wright et al., *Mol. Cell. Biol.* March 2010 vol. 30 no. 6 1411-1420] 참조.
- [0271] 유전적 요인은 PCR 기반 검정법, 예를 들어 정량적 PCR, 경쟁적 PCR을 포함한, 당업자에게 공지된 방법으로 분석될 수 있다. 예를 들어, 대상체로부터 수득된 샘플에서 유전적 요인의 존재를 결정함으로써 섬유증의 진단이 확정될 수 있고/있거나, 대상체가 섬유증 발병의 위험이 있는 것으로 분류될 수 있고/있거나, 대상체가 IL-11의 작용을 억제할 수 있는 제제 또는 IL-11 또는 IL-11R의 발현을 방지하거나 감소시킬 수 있는 제제를 이용한 치료에 적합할 수 있다고 확인될 수 있다.
- [0272] 일부 방법은 IL-11의 분비와 관련된 하나 이상의 SNP의 존재 또는 섬유증 발병에 대한 민감성을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. SNP는 대체로 2개의 대립유전자형(bi-allelic)이므로, 당업자에게 공지된 다수의 통상적인 검정법 중 하나를 이용하여 용이하게 결정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Anthony J. Brookes. *The essence of SNPs*. *Gene* Volume 234, Issue 2, 8 July 1999, 177-186; Fan et al., *Highly Parallel SNP Genotyping*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2003. 68: 69-78; Matsuzaki et al., *Parallel Genotyping of Over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array*. *Genome Res.* 2004. 14: 414-425] 참조).
- [0273] 방법은 어떤 SNP 대립유전자가 대상체로부터 수득된 샘플에 존재하는지를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 소수 대립유전자의 존재를 결정하는 것은 증가된 IL-11 분비 또는 섬유증 발병에 대한 민감성과 관련이 있을 수 있다.
- [0274] 따라서, 본 발명의 일 양태에서, 대상체를 스크리닝하는 방법은,
- [0275] 대상체로부터 핵산 샘플을 수득하는 단계;
- [0276] 도 33, 및/또는 도 34 및/또는 도 35에 열거된 SNP, 또는 $r^2 \geq 0.8$ 을 갖는, 열거된 SNP 중 하나와 연쇄 불평형(linkage disequilibrium) 관계에 있는 SNP 중 하나 이상의 다형성 뉴클레오티드 위치에 어떤 대립유전자가 샘플에 존재하는지를 결정하는 단계
- [0277] 를 포함한다.
- [0278] 결정 단계는 선택된 다형성 뉴클레오티드 위치에서 소수 대립유전자가 샘플에 존재하는지를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 그것은 0, 1 또는 2개의 소수 대립유전자가 존재하는지를 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0279] 스크리닝 방법은 섬유증 발병에 대한 대상체의 민감성을 결정하기 위한 방법 또는 본원에 기술된 바와 같은 진단 또는 예후 방법일 수 있거나, 이의 일부를 구성할 수 있다.
- [0280] 방법은 예를 들어, 대상체가 다형성 뉴클레오티드 위치에 소수 대립유전자를 가지는 것으로 결정될 경우, 대상체를 섬유증 발병에 대해 민감성이 있거나 섬유증 발병의 위험이 큰 것으로 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다. 방법은 인터루킨 11(IL-11)의 작용을 억제할 수 있는 제제를 이용한 치료를 위한 대상체를 선택하고/선택

하거나 대상체에 섬유증에 대한 치료를 제공하거나 대상체의 섬유증 발병 또는 진행을 예방하기 위해 인터루킨 11(IL-11)의 작용을 억제할 수 있는 제제를 대상체에 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [0281] 결정될 수 있는 SNP는 도 33, 도 34, 또는 도 35에 열거된 SNP 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 도 33에 열거된 SNP 중 하나 이상을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 도 34에 열거된 SNP 중 하나 이상을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 도 35에 열거된 SNP 중 하나 이상을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. SNP는 낮은 P 값 또는 FDR(false discovery rate)을 갖는 것으로 결정하도록 선택될 수 있다.
- [0282] 일부 구현예에서, SNP는 트랜스에서(in *trans*)의 VSTstim의 조절을 기초로 한 항 IL-11 치료에 대한 반응의 양호한 예측 인자로서 선택된다(도 33). 일부 구현예에서, 방법은 다음 SNP 중 하나 이상에 대해 어떤 대립유전자가 존재하는지를 결정하는 단계를 포함할 수 있다: rs10831850, rs4756936, rs6485827, rs7120273, 및 rs895468. 일부 구현예에서, SNP는 시스에서(in *cis*)의 VSTstim-VSTunstim의 조절을 기초로 한 항 IL-11 치료에 대한 반응의 양호한 예측 인자로서 선택된다(도 34).
- [0283] 일부 구현예에서, SNP는 트랜스에서의 VSTstim-VSTunstim의 조절을 기초로 한 항 IL-11 치료에 대한 반응의 양호한 예측 인자로서 선택된다(도 35). 일부 구현예에서, 방법은 다음 SNP 중 하나 이상에 대해 어떤 대립유전자가 존재하는지를 결정하는 단계를 포함할 수 있다: rs7120273, rs10831850, rs4756936, rs6485827(도 35).
- [0284] SNP: rs7120273, rs10831850, rs4756936, rs6485827은 11번 염색체 상에서 서로 높은 연쇄 불평형(LD) 관계에 있으므로(소위 LD 블록), 매우 흔하게 공동유전된다(co-inherited).
- [0285] 유전자 빈도의 상관관계의 제곱(r^2)은 두 개의 SNP 사이의 연쇄 불평형(LD)의 정도를 반영한다. 게놈의 근거리 영역 및 공동유전 영역의 SNP 사이의 LD의 결과로서, 주어진 SNP의 유전자형은 태그(tagging)/프록시(proxy) SNP의 유전자형을 결정함으로써 추론될 수 있다. 쌍별(pairwise) 태그/프록시 SNP를 확인하기 위해 당해 분야에서 사용되는 LD의 한계점은 0.8의 r^2 값이다(Wang et al. 2005, Nat. Rev. Genet. 6(2): 109-18; Barrett et al. 2006, Nat Genet., 38 (6): 659-662). 따라서, 주어진 SNP의 유전자형은 r^2 값 ≥ 0.8 의 연쇄 불평형 관계의 태그/프록시 SNP의 유전자형을 결정함으로써 추론될 수 있다.
- [0286] SNP의 뉴클레오타이드 서열은 "rs" 번호를 사용하여 표시된다. 전체 서열은 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>에서 접근할 수 있는 미국 국립생물정보센터(NCBI)의 단일 뉴클레오타이드 다형성 데이터베이스(dbSNP)로부터 이용할 수 있다.
- [0287] 진단 또는 예후 방법은 대상체로부터 수득된 샘플에 대해 또는 대상체로부터 수득된 샘플의 가공 후에 시험관 내에서 수행될 수 있다. 일단 샘플이 수집되면, 환자는 수행될 시험관 내 진단 또는 예후 방법을 위해 존재할 필요가 없으므로, 방법은 인체 또는 동물체에서는 실행되지 않는 방법일 수 있다.
- [0288] 진단 또는 예후의 정확성을 높이거나 본원에 기술된 시험을 이용하여 수득된 결과를 확인하기 위해 본원에 기술된 시험과 함께 기타 진단 또는 예후 시험이 이용될 수 있다.
- [0289] 본 발명에 따른 방법은 시험관 내에서, 생체 외에서, 또는 생체 내에서 수행될 수 있거나, 생물체가 시험관 내에, 생체 외에, 또는 생체 내에 존재할 수 있다. 용어 "시험관 내(in *vitro*)"는 실험실 조건 또는 배양물에서 물질, 생물학적 물질, 세포 및/또는 조직을 이용한 실험을 포괄하고자 한 것이고, 용어 "생체 내(in *vivo*)"는 온전한 다세포 생물을 이용한 실험 및 절차를 포괄하고자 한 것이다. "생체 외(*Ex vivo*)"는 생물체 외부, 예를 들어 인체 또는 동물체 외부에 존재하거나 외부에서 발생하는 것을 지칭하며, 이는 생물체로부터 채취된 조직(예를 들어, 전체 기관) 또는 세포일 수 있다.
- [0290] 본 발명은 조합이 명백하게 허용될 수 없거나 명시적으로 회피되는 경우를 제외하고는 설명된 양태 및 바람직한 특징의 조합을 포함한다.
- [0291] 본 설명에 사용된 섹션 표제는 오로지 편제상의 목적을 위한 것으로, 설명된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0292] 이제 본 발명의 양태 및 구현예를 첨부된 도면을 참조하여 예로서 설명할 것이다. 추가적인 양태 및 구현예는 당업자에게 명백할 것이다. 본문에 언급된 모든 문서는 본 설명에 참조로서 포함된다.
- [0293] 후술하는 청구범위를 비롯한 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다" 및 "포함

한다" 및 "포함하는"과 같은 변이형은 언급된 정수 또는 단계, 또는 정수 또는 단계의 집단을 포함하지만, 임의의 기타 정수 또는 단계, 또는 정수 또는 단계의 집단을 제외하지 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0294]

명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수형 "a," "an," 및 "the"는 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다는 점을 알아야 한다. 범위는 본 설명에서 "약" 하나의 특정한 값에서부터 및/또는 "약" 또 다른 특정한 값까지로서 표현될 수 있다. 이러한 범위가 표현될 때, 또 다른 구현에는 하나의 특정한 값에서부터 및/또는 다른 하나의 특정한 값까지를 포함한다. 마찬가지로, 값이 근사값으로 표현될 때, 선행하는 "약"의 사용에 의해, 특정한 값이 또 다른 구현예를 형성함이 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0295]

이제 본 발명의 원리를 설명하는 구현예 및 실험을 첨부된 도면을 참조하여 논의할 것이다.

도 1. TGF β 1 자극은 섬유아세포에서 IL-11을 상향 조절한다. 원발성 섬유아세포는 80명의 개인의 인간 심방 조직으로부터 유래된 것이고, TGF β 1(5 ng/ml)과 함께 및 TGF β 1(5 ng/ml) 없이 24시간 동안 배양하였다. (a) 11,433개의 발현된 유전자와 비교하여 IL-11이 TGF β 1 자극 섬유아세포에서 가장 상향 조절된 유전자임을 보여주는 도표(FPKM ≥ 0.5). (b) TGF β 1로 섬유아세포를 활성화시킨 후 IL-11 발현이 평균적으로 8배 넘게 유의미하게 증가되었음을 보여주는 도표(FDR = 9.1×10^{-125}). (c) RT-qPCR이 IL-11 RNA 발현을 기반으로 한 배수 변화를 확인하였음을 보여주는 도표(TGF β 1+ / TGF β 1-; $R^2=0.94$) 및 (d) ELISA가 자극된 섬유아세포에 의해 분비된 IL-11 단백질의 유의미한 증가를 검출하였음을 보여주는 도표.

도 2. 인간 심방 섬유아세포를 24시간 동안 5 ng/ml TGF β 1 또는 5 ng/ml IL-11과 함께 배양하였다. 도표는 근 섬유아세포 및 증식성이 높은 세포를 확인하고, 세포 외 매트릭스 단백질의 생산을 정량화하기 위한 (a) α -SMA(근섬유아세포), (b) EdU(증식), (c) 콜라겐 및 (d) 페리오스틴에 대한 세포 염색을 보여준다. IL-11은 TGF β 1 신호 전달과 유사한 비율로 근섬유아세포의 비율을 증가시키고, 콜라겐 및 페리오스틴의 생산을 유도하는 것으로 나타났다. 이 실험을 여러 번 반복하여 비슷한 결과를 얻었다.

도 3. 중화 항체를 이용한 IL-11의 억제제는 TGF β 1 유도성 섬유증을 예방한다. 인간 심방 섬유아세포를 TGF β 1(5 ng/ml), TGF β 1, 및 IL-11 또는 TGF β 1에 대한 항체 및 아이소타입 대조군으로 자극하였다. 도표 및 사진은 근 섬유아세포 및 증식성이 높은 세포를 확인하고, 세포 외 매트릭스 단백질의 생산을 정량화하기 위한 (a) α -SMA, (b) EdU, (c) 콜라겐 및 (d) 페리오스틴에 대한 24시간 후의 염색된 세포를 보여준다. 조건당 최대 21개 필드에 대한 오페레타(Operetta) 플랫폼에서 형광을 정량화하였다. 이 실험을 상이한 개체로부터 유래된 섬유아세포로 반복하여 비슷한 결과를 얻었다. IL-11을 차단하는 항체의 존재하에서, TGF β 1-자극 섬유아세포는 대조군 세포에 비해 감소된 비율의 근섬유아세포를 가지고, 증식성이 더 적으며, 더 적은 콜라겐과 페리오스틴을 발현한다. 이것은 IL-11이 자가분비 및/또는 주변분비 피드 포워드(feed forward) 방식으로 작용하는 TGF β 1 신호 전달 경로의 필수적인 구성요소이며, 그것의 억제제는 인간에서 섬유증의 이 핵심 조절인자의 섬유증 촉진 효과를 감소시킴을 보여준다.

도 4. TGF β 1 자극은 섬유아세포에서 IL-11을 상향 조절한다. 원발성 섬유아세포는 80명의 개인의 인간 심방 조직으로부터 유래된 것이고, TGF β 1(5 ng/ml)과 함께 및 TGF β 1(5 ng/ml) 없이 24시간 동안 배양하였다. (a) 글로벌 전사체 프로파일링(global transcriptome profiling)으로 평가된 바에 따라 게놈 전체에 걸친 11,433개의 발현 유전자와 비교하여 IL-11이 TGF β 1 자극 섬유아세포에서 가장 상향 조절된 RNA 전사체임(FPKM ≥ 0.5)을 보여주는 도표. (b) GTEX 프로젝트(Consortium, Gte. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science (New York, N.Y.)* **348**, (2015))로 평가한 모든 인간 조직과 비교한, 자극되지 않은(TGF- β -) 원발성 인간 섬유아세포 및 자극된(TGF- β +) 원발성 인간 섬유아세포의 IL-11 발현을 보여주는 도표로서, 섬유아세포 및 특이적으로 활성화된 섬유아세포에 대해 증가된 IL-11 수준의 높은 특이성을 나타내며, 이의 특징은 여러 세포 유형 및 소수의 IL-11 발현 섬유아세포를 함유하는 전체 기관(organ)의 수준에서는 평가되지 않는다.

도 5. IL-11은 섬유아세포에 자가분비 인자로서 작용하고, 번역 조절만으로 그 자체의 발현을 유도한다. 원발성 섬유아세포를 24시간 동안 TGF- β 로 자극하였다. (a) IL-11 RNA 발현이 80명의 개인에 걸쳐 평균적으로 8배 넘게 유의미하게 증가되었음(FDR = 9.1×10^{-125})을 보여주는 도표. (b) 자극된 섬유아세포에 의해 분비된 IL-11 단백질의 유의미한 증가(t-검정)를 확인시켜주는 ELISA 분석 결과를 보여주는 도표(t-검정). (c) IL-11과의 원발성 섬유아세포의 배양이 IL-11 RNA 수준을 증가시키지 않음을 보여주는 도표(RT-qPCR). (d) ELISA로 검출된 바

와 같이 IL-11과의 원발성 섬유아세포의 배양이 IL-11 단백질 분비를 유의미하게 유도함(던넛(Dunnett))을 보여주는 도표. 조정된 P 값은 **** $P < 0.0001$ 로 제공된다.

도 6. IL-11은 섬유아세포의 증식 및 활성화뿐만 아니라 세포 외 매트릭스 생산을 유도하며, TGF β 1 매개성 섬유증의 반응에 필요하다. 3명의 개인으로부터 유래된 심장 섬유아세포를 24시간 동안 TGF β 1(5 ng/ml), IL-11(5 ng/ml) 또는 TGF β 1 및 중화 IL-11/대조군 항체와 배양하였다. 도표와 사진은 (a) 섬유아세포의 비율을 추정하기 위한 α -SMA 함량, (b) 활발하게 증식 중인 세포를 추적하기 위한 EdU, (c) ECM 생산을 추정하기 위한 페리오스틴에 대한, 배양 후의 세포 염색 결과를 보여준다. 각 환자별로 2개 웰에 걸친 14개 필드에 대해 오페레타 플랫폼으로 형광을 측정하였다. 또한, 도표는 ELISA를 통해 평가된 섬유증 마커 (d) IL-6, (e) TIMP1 및 (f) MMP2의 분비를 보여준다. 형광을 자극이 없는 대조군에 대해 정규화시키고, 표준 편차와 함께 평균을 나타냈다. IL-11은 TGF β 1과 비슷한 수준으로 섬유증 반응을 유도하고, IL-11의 억제제는 단백질 수준에서 TGF β 1 표현형을 구제(rescue)한다. 조정된 P 값은 비자극 세포와 비교하여 실험군의 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 또는 **** $P < 0.0001$ 로 제공된다(던넛). 이상치(outlier)는 제거하였다(ROUT, $Q = 2\%$).

도 7. IL-11은 콜라겐 단백질 합성을 촉진하고, RNA 수준에서 TGF β 1의 섬유증 촉진 효과를 지연시킨다. 3명의 개인으로부터 유래된 심장 섬유아세포를 24시간 동안 TGF β 1(5 ng/ml), IL-11(5 ng/ml) 또는 TGF β 1 및 중화 IL-11 항체와 배양하였다. 배양 후, (a) 배양 후 오페레타 검정법을 이용하여 콜라겐에 대한 세포 염색의 결과를 보여주는 도표; 도 6에 대해 상기 기술된 바와 같이 형광을 정량화하였음, (b) 시리우스 레드 염색으로 평가한 분비된 콜라겐 수준을 보여주는 도표, 및 (c) RT-qPCR로 측정된 콜라겐 RNA 수준을 보여주는 도표. IL-11은 단백질 수준에서만 TGF β 1과 비슷한 수준으로 섬유증 반응을 유도한다. TGF β 1에 의한 콜라겐 RNA 전사체의 더 높은 발현은 IL-11이 항체로 중화되었을 경우에는 증가된 단백질 생산을 유도하지 않았다. 조정된 P 값은 비자극 세포 대조군과 비교하여 실험군의 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 또는 **** $P < 0.0001$ 로 제공된다(던넛).

도 8. IL-11은 여러 조직에 걸친 섬유증 마커이자 활성인자이다. IL-11의 발현은 TGF β 1 이외에 다양한 상류 섬유증 촉진 자극인자 세트에 의해 유도될 수 있다. (a) IL-11 발현에 미치는 TGF β 1의 영향을 보여주는 도표. (b) ET-1(엔도텔린)이 간 및 폐 섬유아세포에서 IL-11을 상향 조절함을 보여주는 도표; (c) PDGF(혈소판 유래 성장 인자)가 신장 섬유아세포에서 IL-11 발현을 유도함을 보여주는 도표. IL-11 RNA 수준을 RT-qPCR로 측정하였다. 조정된 P 값은 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 또는 **** $P < 0.0001$ 로 제공된다(던넛). IL-11의 전신성 효과를 조사하기 위해, C57BL/6 마우스에 주 6회 식염수 단독(회색) 또는 재조합 IL-11(검은색)을 주사하였다(200 μ g/kg). 조직의 콜라겐 함량을 단백질 수준에서 하이드록시프롤린 검정법(퀵자임(QuickZyme))으로 평가하였고, 결과를 도표 (d)로 나타내었다. IL-11로 처리한 동물의 조직은 대조군보다 더 높은 콜라겐 단백질 함량을 나타낸다(ANOVA; $p = 0.012$). (e) IL-11 처리 마우스의 신장 및 심장에서 α SMA 수준이 증가됨을 보여주는 웨스턴 블롯의 사진으로, 근섬유아세포의 존재를 보여준다.

도 9. 섬유성 반응의 필수적인 조절인자로서의 IL-11의 역할을 보여주는 도해. IL-11은 섬유증 반응에 필수 조절인자이다. 조직 손상이나 만성 염증에 대한 반응으로, TGF β 1, ET-1 또는 PDGF와 같은 사이토카인이 방출되어 섬유증 마커 유전자의 전사를 상향 조절한다. 그런 다음, 이러한 상류 자극에 반응하여 자가분비 체제 IL-11이 생산되고, 상향 조절된 전사체가 세포 특이적인 방식으로 기능적으로 관련 있는 단백질로 효율적으로 번역되게 한다. IL-11의 억제는 핵심 세포 외 매트릭스 및 근섬유아세포 단백질의 합성을 차단하고, 다양한 상류 자극 세트의 섬유증 촉진 작용을 막는다.

도 10. IL-11의 억제제는 섬유증 촉진 사이토카인인 ANG2(안지오텐신 II), PDGF 및 ET-1에 반응하여 콜라겐 단백질 합성을 중지시킨다. 심장 섬유아세포를 24시간 동안 ANG2, PDGF 또는 ET-1 및 중화 IL-11 항체와 배양하였다. 배양 후 세포를 콜라겐에 대해 염색하고, 형광을 정량화하였다. 이러한 자극은 TGF β 1과 비슷한 수준으로 섬유증 반응을 유도한다. 그러나, IL-11이 항체로 중화되는 경우 콜라겐 발현은 증가되지 않는다. P 값은 **** $P < 0.0001$ 로 제공된다(t-검정).

도 11. Genbank 등록번호 gi|391353405|ref|NM_000641.3(호모 사피엔스 인터루킨 11(IL11), 전사체 변이형 1, Mrna)으로부터 취한 인간 IL-11의 뉴클레오타이드 서열[서열번호 1]. 밑줄 친 서열은 IL-11 mRNA를 암호화한다. 음영 처리된 서열을 IL-11 녹다운(knockdown) siRNA의 설계에 이용하였으며, 별도로 서열번호 2 내지 5로 나타내었다. 서열번호 3 및 4는 서열번호 1 내에서 서로 중첩된다.

도 12. Genbank 등록번호 gi|975336|gb|U32324.1|HSU32324(인간 인터루킨-11 수용체 알파 사슬 mRNA, 완전한

cds)로부터 취한 인간 IL-11R α 의 뉴클레오타이드 서열[서열번호 6]. 밑줄 친 서열은 IL-11R α mRNA를 암호화한다. 음영 처리된 서열을 IL-11R α 녹다운 siRNA의 설계에 이용하였으며, 별도로 서열번호 7 내지 10으로 나타내었다.

도 13. IL-11의 녹다운에 대한 siRNA 서열[서열번호 11 내지 14]을 나타내는 표.

도 14. IL-11R α 의 녹다운에 대한 siRNA 서열[서열번호 15 내지 18]을 나타내는 표.

도 15. HEK 세포에서 IL-11R α 의 siRNA 녹다운을 보여주는 도표.

도 16. TGF β 1 자극이 있을 때와 없을 때의 160명의 개인으로부터의 인간 심방 섬유아세포의 전체 전사체 시퀀싱에 대한 리드 깊이(read depth)를 보여주는 그래프.

도 17. 기원 조직(인간 심방 조직 샘플, n=8) 및 원발성, 비자극 섬유아세포 배양물의 RNA-seq에 의해 결정된 내피, 심근세포 및 섬유아세포 마커 유전자의 발현을 보여주는 그래프. (a) PECAM1, (b) MYH6 (c) TNNT2, (d) COL1A2, 및 (e) ACTA2.

도 18. TGF β 1 자극에 대한 섬유아세포에서의 IL-11 발현의 상향 조절을 보여주는 그래프. (a와 b) 섬유증에서 유전자 발현의 배수 변화를 보여주는 그래프; IL-11은 TGF β 1 처리에 대해 가장 상향 조절된 유전자이다. (c) TGF β 1 자극에 대한 섬유아세포에 의한 IL-11 분비. (d) TGF β 1 자극 존재 또는 부재 시, 건강한 개인의 조직 및 심방 섬유아세포에서의 IL-11 유전자 발현의 비교. (e) RNA-seq 대 qPCR로 결정한 IL-11 발현의 배수 변화의 부합 정도.

도 19. ELISA에 의해 결정된 바와 같은, 다양한 섬유증 촉진 사이토카인에 의한 원발성 섬유아세포에서의 IL-11 분비 유도를 보여주는 그래프. (a) TGF β 1, ET-1, AngII, PDGF, OSM 및 IL-13은 IL-11 분비를 유도하고, IL-11 또한 양성 피드백 루프에서 IL-11 발현을 유도한다. (b) ELISA가 세포로부터 분비된 천연 IL-11만을 검출하고, IL-11 자극 조건에 사용되는 재조합 IL-11은 검출하지 않음을 보여주는 그래프. (c)와 (d) 세포를 재조합 IL-11로 자극하고, IL-11 RNA를 측정하고, 천연 IL-11 단백질 수준을 지시된 시점에서 ELISA에 의해 세포 배양물 상층액에서 측정하였다.

도 20. TGF β 1 또는 IL-11 자극에 대한 심방 섬유아세포로부터의 근섬유아세포 생성 및 TGF β 1 또는 IL-11 자극에 대한 심방 섬유아세포에 의한 ECM의 생산 및 사이토카인 발현을 보여주는 그래프 및 이미지. (a) α -SMA, 콜라겐 또는 페리오스틴에 대한 염색 후 형광 현미경으로 측정한, TGF β 1 또는 IL-11 자극 후의 원발성 심방 섬유아세포에 의한 근섬유아세포 생성 및 ECM 생산. (b) 시리우스 레드 염색으로 결정한 세포 배양물 상층액의 콜라겐 함량. ELISA로 측정한 섬유증 마커인 (c) IL-6, (d) TIMP1 및 (e) MMP2의 분비. (f) 인간 또는 마우스 재조합 IL-11로의 자극에 의한 쥐 섬유아세포의 활성화. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ [평균 \pm SD, 던넛트].

도 21. IL-11의 섬유증 촉진 효과를 보여주는 그래프. (a) 상이한 기원 조직으로부터의 마우스 섬유아세포가 IL-11에 의해 활성화될 수 있고, 증가된 ECM 생산을 나타낼 수 있다. [평균 \pm SD, 던넛트]. 마우스에 재조합 IL-11 또는 AngII를 주사하면 (b) 기관 중량이 증가하고 [평균 \pm SEM], (c) (HPA 검정법으로 결정된) 콜라겐 함량이 증가한다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ [평균 \pm SD, 던넛트].

도 22. IL-11이 섬유아세포에 대한 TGF β 1의 섬유증 촉진 효과에 필요함을 보여주는 그래프 및 이미지. (a) (a) α -SMA, (b) EdU 또는 (c) 페리오스틴에 대한 염색 후 형광 현미경으로 측정한 바에 따른, TGF β 1을 이용한 자극 유무, 그리고 중화 항 IL-11 항체 또는 아이소타입 대조군 IgG의 존재/부재하에서, 원발성 심방 섬유아세포에 의한 근섬유아세포 생성 및 ECM 생산. (d 내지 f) 섬유증 마커인 (d) IL-6, (e) TIMP1 및 (f) MMP2의 분비를 ELSIA로 분석하였다. 자극이 없는 대조군에 대해 형광을 정규화하였다. [평균 \pm SD, 던넛트] * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 또는 **** $P < 0.0001$.

도 23. TGF β 1에 의해 촉발된 콜라겐 생산에 미치는 IL-11의 중화 효과를 보여주는 그래프 및 이미지. (a) 오펜데타 검정법 또는 (b) 시리우스 레드 염색에 의해 결정한 바에 따른, TGF β 1 자극의 유무 및 중화 항-IL-11 항체 또는 아이소타입 대조군 IgG의 존재/부재하에서의 심장 섬유아세포에 의한 콜라겐 생산. [평균 \pm SD, 던넛트] * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 또는 **** $P < 0.0001$.

도 24. 다양한 IL-11 및 IL-11R α 길항제의 섬유증을 억제하는 능력을 보여주는 그래프. 인간 심방 섬유아세포

를 IL-11에 대한 중화 항체, IL-11R α 에 대한 중화 항체, IL-11에 결합하는 유인 IL-11 수용체 분자, IL-11 발현을 하향 조절하는 siRNA 또는 IL-11RA 발현을 하향 조절하는 siRNA로 처리하고, 시험관 내에서 섬유아세포에서의 TGF β 1 유도성 섬유증 촉진 반응에 미치는 효과를 분석하였다. [평균 \pm SD, 던넛트] * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 또는 **** P < 0.0001.

도 25. IL-11-RA 녹아웃 마우스로부터의 섬유아세포의 섬유증 촉진 처리에 대한 반응을 보여주는 막대 도표. IL-11RA WT(+/-), 이형 접합성(+/-) 및 동형 접합성 널(null) (-/-) 마우스로부터 유래된 섬유아세포를 24시간 동안 TGF β 1, IL-11 또는 AngII(5 ng/ml)과 배양하였다. (a) α SMA 함량 분석으로 결정한 근섬유아세포의 백분율, (b) EdU 염색으로 결정한 증식하는 세포의 백분율, (c) 콜라겐 함량 및 (d) 페리오스틴 검출로 측정된 ECM 생산[평균 \pm SD].

도 26. 다양한 섬유증 촉진 자극에 반응하여 섬유증에 미치는 IL-11 중화의 효과를 보여주는 그래프. 여러 가지 상이한 섬유증 촉진 인자의 존재/부재하에서, 그리고 중화 항 IL-11 항체 또는 pan 항-TGF β 항체의 존재/부재하에서, 섬유아세포를 시험관 내에서 배양하였다. (a) 콜라겐 생산 및 (b) α SMA 발현 분석으로 결정한 근섬유아세포 생성. [평균 \pm SD, 던넛트] * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 또는 **** P < 0.0001.

도 27. AngII 처리 후 WT 및 IL-11RA (-/-) 동물의 심방 및 심장에서 섬유증 마커의 발현을 보여주는 막대 도표. (a) 하이드록시프롤린 검정법으로 측정된 콜라겐 함량. (b) 콜라겐(Col1A2) 발현. (c) α SMA(ACTA2) 발현. (d) 피브로넥틴(Fn1) 발현.

도 28. 신장 조직에서의 콜라겐 함량으로 측정된, 염산 유도성 신장 섬유증에 미치는 IL-11RA 녹아웃의 영향을 보여주는 그래프.

도 29. IL-11RA +/+ 마우스와 비교한, IL-11RA -/- 마우스에 대한 (a) 폐, (b) 피부 및 (c) 눈에서의 섬유증 분석을 위한 실험 절차 개략도.

도 30. 유전자 발현의 배수 변화를 보여주는 산점도(scatterplot). (a) TGF β 1, IL-11 또는 TGF β 1 및 IL-11 자극 후 섬유아세포에서의 유전자 발현의 배수 변화. (b) TGF β 1 자극 후 IL-11RA+/+ 및 IL-11RA-/- 마우스로부터 수득된 섬유아세포에서의 유전자 발현의 배수 변화.

도 31. 섬유증절제(여과 수술) 후 상처 치유 및 눈의 섬유증에 미치는 IL-11RA 녹아웃의 영향을 보여주는 사진. (a) 여과 수술 7일 후 IL-11RA+/+(WT) 및 IL-11RA-/(KO) 동물의 눈 박편. (b) 피크로시리우스 레드(picric sirius red)/편광 광선 기법(Szendroi et al. 1984, Acta Morphol Hung 32, 47-55)으로 평가한 콜라겐 섬유증의 성숙; KO 마우스에서보다 WT 마우스에서 섬유증이 더 많이 관찰되었다.

도 32. TGF β 1 자극에 반응하여 섬유증에 미치는 유인 IL-11 수용체의 영향을 보여주는 그래프. 여러 가지 상이한 농도의 (a) D11R1(유인 수용체 50aa 링커) 또는 (b) D11R2(유인 수용체 33aa 링커)의 존재 또는 부재하에서, TGF β 1(5 ng/ml)의 존재/부재하에서 섬유아세포를 시험관 내에서 배양하였다. 24시간 후 근섬유아세포 생성(즉, 활성화된 섬유아세포의 백분율)을 α SMA 발현 분석으로 결정하였다.

도 33. 트랜스에서 IL-11 VST_{stim}의 SNP 조절을 보여주는 표.

도 34. 시스에서 IL-11 VST_{stim} - VST_{unstim}의 SNP 조절을 보여주는 표.

도 35. 트랜스에서 IL-11 VST_{stim} - VST_{unstim}의 SNP 조절을 보여주는 표.

도 36a, 36b, 36c 및 36d 로컬(local) SNP에 의한 IL-11 반응의 조절을 보여주는 도표. 69명의 유전자형 개체로부터 유래된 자극되지 않은 섬유아세포 및 자극된(TGF β 1, 5 ng/ml, 24시간) 섬유아세포의 RNA를 시퀀싱하였다. 샘플을 유전자형에 따라 그룹화하고, IL-11 발현의 증가(VST_{stim}-VST_{unstim})를 0, 1, 또는 2개의 소수 대립유전자를 가진 그룹 사이에서 비교하였다.

도 37. 원거리(distant) SNP에 의한 IL-11 반응의 조절을 보여주는 도표. 69명의 유전자형 개체로부터 유래된 자극되지 않은 섬유아세포 및 자극된(TGF β 1, 5 ng/ml, 24시간) 섬유아세포의 RNA를 시퀀싱하였다. 샘플을 유전자형에 따라 그룹화하고, IL-11 발현의 증가(VST_{stim}-VST_{unstim})를 0 또는 1개의 소수 대립유전자를 가진 그룹 사이에서 비교하였다.

도 38a, 38b, 38c 및 38d. IL-11이 간 섬유증에서 TGF β 1의 섬유증 촉진 효과에 필요함을 보여주는 그래프. 비 자극 세포(기준선)와 비교하여 (a) α -SMA 양성 세포, (b) EdU 양성 세포, (c) 콜라겐 양성 세포 및 (d) 페리오스틴 양성 세포의 비율 분석에 의해 측정된, TGF β 1 자극의 유무 및 중화 항 IL-11 항체 또는 아이소타입 대조군 IgG의 존재/부재하에서의 원발성 인간 간 섬유증의 활성화 및 증식. [평균 \pm SD, 던넛트] * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 또는 **** $P < 0.0001$.

도 39. IL-11이 피부 섬유증에서 TGF β 1의 섬유증 촉진 효과에 필요함을 보여주는 막대 도표. α -SMA 양성 세포(활성화된 섬유아세포)의 핵분열 분석으로 측정된, TGF β 1 자극의 유무 및 중화 항-IL-11 항체의 존재/부재하에서의 마우스 피부 섬유아세포의 활성화.

도 40. IL-11 신호 전달 유무에 따른 폐 섬유아세포의 세포 이동을 보여주는 막대 도표. IL-11RA+/+(WT) 및 IL-11RA-/- (KO) 동물로부터의 폐 섬유아세포의 이동을 자극 없이 또는 TGF β 1 또는 IL-11의 존재하에서 시험관 내 스크래치 검정법으로 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

실시예 1

섬유증 반응은 활성화된 상재(resident) 섬유아세포의 광범위한 분자적 변화를 특징으로 한다. 이 전이의 핵심 마커로서의 IL-11의 역할을 확립하기 위해, 형질전환 성장인자 베타-1(TGF β 1) 활성화 전과 활성화 24시간 후에 80명의 개인으로부터 유래된 심방 섬유아세포의 전체 RNA 발현 차이를 평가하고 순위를 매겼다. 관상동맥질환을 위해 심장 수술을 받은 80명의 개인의 심방으로부터 유래된 원발성 섬유아세포를 배양하였다. 표현형 분석 및 유전자형 분석과 조합시킨 유전자-다형(genome-wide) 발현 프로파일링(RNA-Seq)을 이용하여 기준선 및 TGF β 1 (강력한 섬유증 촉진 자극)을 이용한 자극 후의 섬유아세포를 생체 외에서 연구하였다.

TGF β 1 처리에 반응하여 IL-11 발현이 상당히 유도되었고, RNA 수준은 30배 (평균적으로 8배 초과) 증가하였다. IL-11 발현은 모든 다른 개별적인 유전자의 발현보다 높았으며(도 1a, 1b), 이는 섬유아세포에서 발현되는 약 11,500개 유전자 중에서 IL-11이 가장 눈에 띄게 상향 조절됨을 의미한다. 이러한 IL-11의 상향 조절은 RT-qPCR 뿐만 아니라 ELISA 실험으로도 확인되었으며(도 1c, 1d), 이는 활성화된 섬유아세포에서의 IL-11 단백질의 증가된 생산 및 방출이 섬유증의 주요 유발요인임을 나타낸다.

IL-11이 섬유증을 유도하는 자가분비 신호전달 인자로서 작용하는지를 평가하기 위해, 자극되지 않은 심방 섬유아세포를 재조합 IL-11과 배양하고 세포 증식, 근섬유아세포 생성 및 단백질 수준에서의 콜라겐 및 페리오스틴 발현을 관찰하였다. 우리는 TGF β 1 신호전달 경로에 의해 유도된 것과 비슷한 수준으로 콜라겐 생산, 세포 증식 및 페리오스틴 발현이 증가함을 관찰하였다. 또한, IL-11 활성화 섬유아세포는 α -SMA+ 근섬유아세포로 분화되었다(도 2).

섬유증 촉진 기능 이외에도, IL-11은 TGF β 1 유도성 섬유증 반응 자체에서 결정적인 역할을 한다는 점 또한 밝혀졌다. 중화 항 인간 IL-11 단일클론 항체(단일클론 마우스 IgG_{2A}; 클론 #22626; 카탈로그 번호 MAB218; 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타 주)를 이용한 IL-11 역제는 TGF β 1을 통한 섬유아세포의 활성화를 감소시켰다. TGF β 1과 함께 배양된 세포는 IL-11 항체가 존재할 때 더 많은 세포 외 매트릭스 단백질을 생성하지 않았다(도 3).

발명자들은 IL-11 중화 항체가 TGF β 1-유도성 섬유아세포 활성화를 방지함을 보여주었다.

실시예 2

염증 및 조직 손상은 섬유아세포의 동원, 증식 및 활성화를 수반하는 동적 과정을 자극하여 세포 외 매트릭스를 생성하고, 상처 치유 및 흉터 형성을 시작한다. 이 섬유증 반응은 활성화된 상재 섬유아세포의 광범위한 분자적 변화를 특징으로 하며, 이는 국소적이고 침윤성인 세포에 의해 방출되는 다기능성 사이토카인인 TGF β 1에 의해 유도될 수 있다.

이 전이의 핵심 마커를 확인하기 위해, 발명자들은 TGF β 1 처리 전과 TGF β 1 처리 24시간 후에 80명의 개개인으로부터 유래된 심방 섬유아세포의 전사체 시퀀싱을 통해 전체 RNA 발현 차이를 평가하고 순위를 매겼다. 실시예 1에서 논의된 바와 같이, IL-11 발현은 활성화된 섬유아세포에서 유의미하게 상향 조절되었으며, 최초로 IL-11 전사 반응이 섬유증에서 조절되는 모든 다른 개별적인 유전자의 전사 반응보다 더 높음을 보여주었다(도 4a).

본 발명의 모델 시스템의 IL-11 발현 수준을 다양한 인간 조직과 비교한 결과 높은 IL-11 수준이 섬유증 반응에 특이적인 것으로도 나타났으며(도 4b), 이는 인체에서 섬유증의 정도를 평가하는 이상적인 마커가 되게 하였다.

[0306] IL-11이 섬유증을 유도하는 자가분비 신호전달 인자로서 작용하는지를 더 평가하기 위해, 본 발명자들은 IL-11 RNA의 상향 조절(도 5a)이 심방 섬유아세포로부터 IL-11 분비를 증가시킨(도 5b)을 확인하였다. IL-11과 섬유아세포의 배양은 IL-11 RNA 발현을 증가시키지는 않았으나(도 5c), 세포로부터 IL-11 분비를 증가시켰다(도 5d). 이것은 섬유아세포에 대해 IL-11이 번역 수준에서 IL-11 단백질의 생산을 조절하는 자가분비 효과를 가지고 있음을 보여준다.

[0307] 다음으로, 본 발명자들은 심방 섬유아세포를 TGF β 1, 재조합 IL-11 또는 TGF β 1 및 중화 항-인간 IL-11 단일클론 항체(단일클론 마우스 IgG_{2A}; 클론 #22626; 카탈로그 번호 MAB218; 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타 주)와 배양하고, 세포 증식, 근섬유아세포 생성 및 단백질 수준에서의 페리오스틴 발현을 관찰하였다. 본 발명자들은 TGF β 1 자극 섬유아세포 및 IL-11 자극 섬유아세포 둘 다에서 비슷한 수준으로 활성화된 섬유아세포(α SMA 양성 세포), 페리오스틴 생산 및 세포 증식의 증가를 관찰하였다. IL-11의 섬유증 촉진 기능 이외에도, IL-11은 TGF β 1 섬유증 자체에서도 결정적인 역할을 한다는 점 또한 밝혀졌다. 우리가 IL-11을 항체로 중화시켰을 때 TGF β 1의 섬유증 촉진 효과가 억제되었다(도 6a 내지 도 6c). IL6, MMP2 및 TIMP1과 같은 섬유증 마커의 분비를 관찰하였을 때, 동일한 패턴이 관찰되었다(도 6d 내지 도 6f).

[0308] 그런 다음, 본 발명자들은 유전자 발현의 몇 가지 조절 수준에 걸친 여러 가지 검정법을 이용하여 섬유증 반응의 질병 특유의 특징인 콜라겐의 침착을 관찰하였다. 예상대로 TGF β 1은 세포 내 콜라겐(도 7a), 분비된 콜라겐(도 7b) 및 콜라겐 RNA 수준(도 7c)을 증가시키는 것으로 나타났다. IL-11에 대한 반응은 단백질 수준에서만 관찰되었고(도 7a, 7b), RNA 수준에서는 관찰되지 않았다(도 7c). IL-11억제와 동시에 TGF β 1을 이용한 자극은 콜라겐 RNA의 증가를 가져왔으나, 이러한 TGF β 1 유도성 효과는 단백질 수준까지는 전달되지 않았다.

[0309] 여러 가지 섬유증 촉진 자극의 하류에서 IL-11의 섬유증에서의 중심적인 역할을 더 확립하기 위해, 본 발명자들은 TGF β 1(도 8a), ET-1(도 8b) 및 PDGF(도 8c)에 반응하여 네 가지의 상이한 조직으로부터 유래된 섬유아세포 집단에 걸친 IL-11 발현을 평가하였다. 또한, 우리는 C57BL/6 마우스에 재조합 IL-11을 전신으로 투여하고, 콜라겐 및 α SMA 발현을 관찰하였다. 콜라겐 생산은 신장, 심장 및 간에 걸쳐 증가되었고(도 8d), 심장 및 신장에서 더 높은 α SMA 단백질 수준으로 표시된 더 활성화된 섬유아세포도 검출하였다(도 8e).

[0310] 이러한 연구 결과는 섬유증에 있어서 IL-11의 신규하고도 중심적인 역할을 보여주며, 더욱 중요하게는 IL-11이 몇몇 조직에 걸쳐 핵심적인 섬유증 촉진 자극들의 하류에 있음을 보여준다. 이러한 결과는 TGF β 1이 전사 조절로부터 단백질 번역으로 나아가는 데 IL-11이 필요하다는 점을 보여준다. IL-11의 억제는 전사체에서 TGF β 1의 섬유증 촉진 효과를 지연시킨다(도 9).

[0311] **실시예 3: 항 IL-11 항체는 섬유증 촉진 자극을 억제한다**

[0312] 도 3c와 관련하여 기술된 것과 비슷한 실험에서, 심방 섬유아세포를 안지오텐신 II(ANG 2), 혈소판 유래 성장인자(PDGF) 및 엔도텔린 1(ET-1)의 형태의 기타 섬유증 촉진 자극에 노출시키고, 콜라겐 생산을 측정하였다.

[0313] IL-11 mRNA 발현의 유도 이외에도, ANG2, PDGF 및 ET-1 각각은 IL-11 단백질 발현을 유도하였다. 중화 항-인간 IL-11 단일클론 항체(단일클론 마우스 IgG_{2A}; 클론 #22626; 카탈로그 번호 MAB218; 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타 주)로의 IL-11의 억제는 이들 섬유증 촉진 자극 각각의 섬유증 촉진 효과를 차단하였고(도 10), 이는 IL-11이 주요 섬유증 촉진 자극(TGF β 1, ANG2, PDGF 및 ET-1)의 중심적인 효과기임을 나타낸다.

[0314] **실시예 4: IL-11R 녹다운**

[0315] HEK 세포를 비 표적화(NT) siRNA 또는 IL11RA1 수용체에 대한 네 가지 상이한 siRNA(siRNA 5-8; 도 14; 서열번호 15 내지 18) 중 하나로 형질감염시켰다(24시간). RNA를 추출하고, qPCR로 IL11RA1 mRNA 발현을 분석하였다. 테이터를 대조군(NT)에 대한 mRNA 발현 수준으로 도 15에 나타내었다.

[0316] **실시예 5: 섬유증에서 IL-11의 역할**

[0317] **5.1 IL-11은 섬유증에서 상향 조절된다**

[0318] 섬유아세포의 활성화된 근섬유아세포로의 전이의 바탕을 이루는 분자적 과정을 이해하기 위해, 싱가포르 국립심장센터(National Heart Centre Singapore)에서 심장 우회수술을 받은 200명이 넘는 환자로부터 심방 조직을 입수하였다. 세포를 시험관 내에서 낮은 계대수(계대수 < 4)에서 배양하고, 24시간 동안 TGF β 1으로 자극시키지

않거나 자극시켰다. 이어서 본 발명자들은 자극되지 않은 섬유아세포 및 160명의 개개인에 걸친 전형적인 섬유증 촉진 자극인 TGF β 1으로 자극시킨 세포의 고속 처리 RNA 시퀀싱(RNA-seq) 분석을 수행하였다. 평균 리드 깊이는 샘플당 약 70M 리드였다(양 말단(paired-end) 100 bp; 도 16).

- [0319] 심방 섬유아세포의 세포 배양물의 순도를 확실히 하기 위해, 우리는 RNA-seq 데이터 세트에서 심방으로부터의 내피세포, 심근세포 및 섬유아세포의 세포 유형 마커 유전자의 발현(Hsu et al., 2012 Circulation Cardiovasc Genetics 5, 327-335)을 분석하였다.
- [0320] 결과를 도 17a 내지 도 17e에 나타내었으며, 심방 섬유아세포 배양물의 순도를 확인하였다.
- [0321] 유전자 발현을 기원 조직(인간 심방 조직 샘플, n=8) 및 원발성, 비자극 섬유아세포 배양물의 RNA-seq에 의해 평가하였다. 내피세포 마커 PECAM1(도 17a), 심근세포 마커 MYH6(도 17b) 및 TNNT2(도 17c)의 발현 없음/매우 낮은 발현이 섬유아세포의 세포 배양물 샘플에서 검출되었다. 섬유아세포에 대한 마커인 COL1A2(도 17d) 및 ACTA2(도 17e)는 기원 조직과 비교하여 높은 정도로 발현되었다.
- [0322] 다음으로, TGF β 1을 이용한 자극 시 발현이 증가되었거나 감소된 유전자를 확인하기 위해 RNA-seq 데이터를 분석하였고, 이 정보를 GTEx 프로젝트(The GTEx Consortium, 2015 Science 348, 648-660)가 제공한 35개 이상의 인간 조직에 걸친 대형 RNA-seq 데이터 세트와 통합하였다. 이것은 섬유아세포-근섬유아세포 전이에 특이적인 유전자 발현 특징의 확인을 가능하게 하였다.
- [0323] 결과를 도 18a 내지 도 18e에 나타내었다. 섬유아세포에서 발현된 10000개 이상의 유전자에 걸쳐, IL-11이 TGF β 1을 이용한 자극에 대한 반응에 대해 가장 강력하게 상향 조절된 유전자였으며, 평균적으로 160명의 개개인에 걸쳐 10배를 초과하여 상향 조절되었다(도 18a).
- [0324] TGF β 1 자극된 섬유아세포의 세포 배양물 상층액의 ELISA 분석으로 IL-11 발현의 상향 조절을 확인하였다(도 18c). 건강한 개인의 다른 조직에서의 IL-11의 발현 수준과 비교하여, 이 반응은 활성화된 섬유아세포에 매우 특이적인 것으로 관찰되었다(도 18d). IL-11 RNA 발현의 여러 배수 변화 또한 qPCR 분석에 의해 확인되었다(도 18e).
- [0325] 다음으로, 섬유아세포를 시험관 내에서 배양하고, 여러 가지 다른 공지된 섬유증 촉진 인자: ET-1, ANGII, PDGF, OSM 및 IL-13, 그리고 인간 재조합 IL-11로 자극하였다. IL-11로의 자극에 반응하여 생산된 IL-11의 상향 조절을 분석하기 위해, ELISA는 세포로부터 분비된 천연 IL-11만을 검출할 수 있고, 자극에 사용된 재조합 IL-11은 검출하지 못함을 확인하였다(도 19b).
- [0326] 결과를 도 19a에 나타내었다. 각각의 인자는 섬유아세포로부터 IL-11을 유의미하게 유도하는 것으로 나타났다. IL-11은 섬유아세포의 자가분비 루프에서 작용하여, 72시간 후에 100배 정도까지 IL-11 단백질의 상향 조절을 일으킬 수 있다(도 19d).
- [0327] 흥미롭게도, IL-11에 대한 이 자가분비 루프는 IL-6의 자가분비 생산과 유사하다. IL-6은 동일한 사이토카인 패밀리에 속하며, 또한 폐암 세포와 유방암 세포의 지속적인 생존 및 성장을 보장하기 위해 제안된 gp130 수용체를 통한 신호이다(Garbers and Scheller, 2013 Biol Chem 394, 1145-1161), 이는 다(Grivennikov and Karin, 2008 Cancer Cell 13, 7-9).
- [0328] IL-11를 이용한 자극에 대한 반응으로 IL-11 RNA 수준에 어떠한 증가도 검출되지 않았다(도 19d). 따라서, RNA 및 단백질 수준 모두에서 IL-11 발현을 증가시키는 TGF β 1와는 달리, IL-11은 전사 후 수준에서만 IL-11 발현을 상향 조절하는 것으로 보인다.
- [0329] 5.2 IL-11은 심장 조직의 섬유증에서 섬유증 촉진 역할을 한다
- [0330] IL-11의 자가분비 생산이 섬유증 촉진성인지 섬유증 억제성인지를 조사하기 위해, 섬유아세포를 재조합 IL-11과 시험관 내에서 배양하고, 근섬유아세포(α SMA 양성 세포)의 비율 및 세포 외 매트릭스 생산을 분석하였다.
- [0331] α SMA, 콜라겐 및 페리오스틴의 발현을 자동화, 고속 처리 방식으로 오페레타 고품량 영상화 시스템(Operetta High-Content Imaging System)으로 관찰하였다. 동시에, MMP2, TIMP1 및 IL-6과 같은 섬유증 마커 단백질의 분비를 ELISA 검정법으로 분석하고, 콜라겐의 수준을 세포 배양물의 상층액의 열량 측정 시리우스 레드 검정법으로 확인하였다.
- [0332] 간략히 설명하자면, 3명의 개개인으로 부터 유래된 심방 섬유아세포를 자극 없이, TGF β 1(5 ng/ml) 또는 IL-11(5 ng/ml)과 함께 24시간 동안 각각 2개 웰에서 배양하였다. 배양 후, 세포를 염색하여 근섬유아세포의 비율을 추

정하기 위해 α -SMA 함량을 분석하였고, ECM 생산을 추정하기 위해 콜라겐과 페리오스틴을 분석하였다. 웰당 7 개 필드에서 형광을 측정하였다. 개체당 2개 웰의 상층액 또한 시리우스 레드 염색에 의해 콜라겐 함량을 평가 하였다. 신호를 자극하지 않은 대조군에 대해 정규화하였다. 섬유증 마커인 IL-6, TIMP1 및 MMP2의 분비를 ELISA를 통해 분석하였다.

[0333] 그 결과를 도 20a 내지 도 20f에 나타내었다. TGF β 1은 섬유아세포를 활성화시켰고, ECM 생산을 증가시켰다(도 20a). 예상 외로, 그리고 과학 문헌의 심장 조직에서 IL-11에 대해 기술된 섬유증 억제적 역할과는 반대로, 재조합 IL-11은 섬유아세포 배양물에서 근섬유아세포의 비율을 증가시켰고, 세포 외 매트릭스 단백질인 콜라겐과 페리오스틴의 생산을 TGF β 1과 동일한 정도로 증진시켰다(도 20a). IL-11과 TGF β 1 사이토카인 모두 섬유증 촉진 마커인 IL-6, TIMP1 및 MMP2의 분비를 유의미하게(도 20b 내지 도 20e), 그리고 비슷한 수준으로 증가시켰다.

[0334] 본 발명자들은 IL-11이 심장 조직에서 섬유증을 촉진한다는 본 연구 결과와 문헌에 기술된 섬유증 억제적 역할 사이의 상충이 이전의 연구에서 설치류에서 인간 IL-11을 사용한 것과 관련이 있을 수 있다고 가정하였다(Obana et al., 2010, 2012; Stangou et al., 2011; Trepicchio and Dorner, 1998).

[0335] 이 가설을 조사하기 위해, 인간 및 마우스 IL-11의 단계별 희석을 수행하고, 인간 심방 섬유아세포의 활성화를 관찰하였다(도 20f). 마우스 세포 상의 낮은 농도의 인간 IL-11에서는 섬유아세포의 활성화가 전혀 관찰되지 않았으며, 이는 IL-11 기능에 대한 이전의 통찰이 부분적으로는 IL-11 비 특이적 관찰에서 비롯될 수 있음을 시사한다.

[0336] 5.3 IL-11은 다양한 조직의 섬유증에서 섬유증 촉진 역할을 한다

[0337] IL-11의 섬유증 촉진 작용이 심방 섬유아세포에 특이적인지를 시험하기 위해, 여러 가지 상이한 조직(심장, 폐, 피부, 신장 및 간)으로부터 유래된 인간 섬유아세포를 시험관 내에서 배양하고, 인간 IL-11로 자극하고, 상기 기술된 바와 같이 섬유아세포 활성화 및 ECM 생산을 분석하였다. 분석된 조직 각각으로부터 유래된 섬유아세포의 비자극 배양물과 비교하여 증가된 섬유아세포 활성화 및 ECM 생산이 관찰되었다.

[0338] 5.3.1 간 섬유증

[0339] IL-11 신호 전달이 간 섬유증에 중요한지를 시험하기 위해, 인간 원발성 간 섬유아세포(셀 바이올로지스(Cell Biologics), Cat#: H-6019)를 96웰 플레이트의 웰에서 낮은 계대수로 배양하고, 자극하지 않거나, TGF β 1(5 ng/ml, 24시간), IL-11(5 ng/ml, 24시간)으로 자극하거나, TGF β 1(5 ng/ml) 및 중화 IL-11 항체(2 μ g/ml), 또는 TGF β 1(5 ng/ml) 및 아이소타입 대조 항체와 배양하였다. 오펜레타 플랫폼을 이용하여 섬유아세포 활성화(α SMA 양성 세포), 세포 증식(EdU 양성 세포) 및 ECM 생산(페리오스틴 및 콜라겐)을 분석하였다.

[0340] 원발성 인간 간 섬유아세포를 이용한 실험 결과를 도 38a 내지 도 38d에 나타내었다. IL-11은 간 섬유아세포를 활성화시키는 것으로 나타났고, IL-11 신호 전달은 간 섬유아세포에서 TGF β 1의 섬유증 촉진 작용에 필수적인 것으로 밝혀졌다. 섬유아세포의 활성화 및 증식 모두가 중화 항 IL-11 항체에 의해 억제되었다.

[0341] 5.3.2 피부 섬유증

[0342] IL-11 신호 전달이 피부 섬유증에 중요한지를 시험하기 위해, 원발성 마우스 피부 섬유아세포를 96웰 플레이트의 웰에서 낮은 계대수로 배양하고, 자극하지 않거나, TGF β 1(5 ng/ml, 24시간)으로 자극하거나, TGF β 1(5 ng/ml) 및 중화 IL-11 항체(2 μ g/ml)와 24시간 동안 배양하였다. 오펜레타 플랫폼을 이용하여 섬유아세포 활성화(α SMA 양성 세포)를 분석하였다.

[0343] 결과를 도 39에 나타내었다. 피부 섬유아세포의 TGF β 1 매개성 활성화는 중화 항 IL-11 항체에 의해 억제되었다.

[0344] 5.3.3 여러 기관에서의 섬유증

[0345] 다음으로, IL-11이 생체 내에서 전체 조직 섬유증을 유도할 수 있는지 시험하기 위해 마우스 재조합 IL-11을 마우스에 주사하였다(100 μ g/kg, 3일/주, 28일).

[0346] 결과를 도 21에 나타내었다. AngII(혈압 상승 및 심장 비대를 유발하는 사이토카인)의 주사와 비교하여, IL-11도 심장 중량을 증가시켰지만, 신장, 폐 및 간 중량은 체중과 연동되었다(도 21b). 하이드록시프롤린 검정법에 의한 이들 조직에서의 콜라겐 함량 평가는 이들 조직에서의 콜라겐 생산의 상향 조절을 밝혀냈으며, 이는 섬유증이 기관 중량의 증가의 원인으로 나타났다(도 6c). 섬유증 마커 유전자 ACTA2(= α SMA), Col1a1, Col3a1,

Fnl, Mmp2 및 Timp1의 발현 또한 이들 동물의 심장, 신장, 폐 및 간 조직으로부터 단리된 RNA의 qPCR 분석에 의해 검출되었다.

[0347] **실시예 6: IL-11/IL-11R 길항작용의 치료적 잠재력**

[0348] **6.1 IL-11/IL-11R의 중화 길항제를 이용한 섬유증 반응의 억제**

[0349] 다음으로, IL-11 분비의 자가분비 루프가 섬유아세포에 대한 TGF β 1의 섬유증 촉진 효과에 필수적인지를 조사하였다.

[0350] 상업적으로 이용 가능한 중화 항체(단일클론성 마우스 IgG2A; 클론 #22626; 카탈로그 번호 MAB218; 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타 주)를 이용하여 IL-11을 억제하였다. 항체의 존재 또는 부재하에 섬유아세포를 TGF β 1로 처리하고, 섬유아세포 활성화, 증식하는 세포의 비율 및 ECM 생산, 그리고 섬유증 반응의 마커를 측정하였다.

[0351] 간략히 설명하자면, 3명의 개개인으로부터 유래된 심방 섬유아세포를 TGF β 1(5 ng/ml) 또는 중화 항 IL-11 항체 또는 아이소타입 대조 항체의 존재하에 TGF β 1과 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 근섬유아세포의 비율을 결정하기 위해 α SMA에 대해 세포를 염색하고, EdU 도입에 대해 세포를 분석하여 증식하는 세포의 비율을 결정하고, ECM 생산을 결정하기 위해 페리오스틴을 측정하였다. 각 개체에 대해 2개 웰에 걸쳐 14개 필드에 대해 오페레타 플랫폼으로 형광을 측정하였다. 섬유증 마커 IL-6, TIMP1 및 MMP2의 분비 또한 ELISA로 분석하였다. 자극 없는 대조군에 대해 형광을 정규화하였다.

[0352] 결과를 도 22a 내지 도 22f에 나타내었다. IL-11 억제는 TGF β 1-유도성 섬유증을 개선하는 것으로 나타났고, IL-11이 TGF β 1의 섬유증 촉진 효과에 필수적인 것으로 밝혀졌다. IL-11의 억제는 단백질 수준에서 TGF β 1 표현형을 '구제(rescue)'하는 것으로 나타났다.

[0353] 콜라겐 생산도 분석하였다. 3명의 개개인으로부터 유래된 심방 섬유아세포를 TGF β 1(5 ng/ml) 또는 TGF β 1 및 중화 IL-11 항체와 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 오페레타 검정법을 이용하여 콜라겐에 대해 세포를 염색하고, 상기 기술된 바와 같이 형광을 정량하였다. 세포 배양물 상층액에서의 분비된 콜라겐 수준을 시리우스 레드 염색으로 평가하였다.

[0354] 결과를 도 23a 및 도 23b에 나타내었고, 이는 중화 항체를 이용하는 IL-11의 억제의 항-섬유증 효과를 확인시켜 준다.

[0355] 다음으로, 여러 다른 IL-11/IL-11R 길항제의 섬유증 억제 능력을 본 설명의 위에서 기술된 심방 섬유아세포, TGF β 1-유도성 근섬유아세포 전이 검정법을 이용하여 시험관 내에서 분석하였다.

[0356] 간략히 설명하자면, 인간 심방 섬유아세포를 시험관 내에서 배양하고, (i) 중화 항-IL-11 항체, (ii) IL-11RA-gp130 융합 단백질 (iii) 중화 항 IL-11RA 항체, (iv) IL-11에 대해 유도된 siRNA 처리 또는 (v) IL-11RA에 대해 유도된 siRNA 처리의 존재/부재하에서, TGF β 1(5 ng/ml)으로 24시간 동안 자극하거나 자극하지 않은 채로 두었다. 활성화된 섬유아세포(근섬유아세포)의 비율을 상기 기술된 바와 같이 α SMA 함량을 평가하여 분석하였다.

[0357] 결과를 도 24에 나타내었다. IL-11/IL-11R의 신호 전달의 길항제 각각은 TGF β 1-매개성 섬유증 촉진 반응을 저지할 수 있는 것으로 나타났다.

[0358] **실시예 7: IL-11/IL-11R 신호 전달의 섬유증 촉진적 역할의 생체 내 확인**

[0359] **7.1 IL-11RA 유전자 녹아웃 마우스로부터 유래된 세포를 이용한 시험관 내 연구**

[0360] 모든 마우스를 사육하고, 동일한 방에 수용하고, 먹이와 물을 무제한으로 제공하였다. IL-11RA에 대한 기능적 대립유전자가 결여된 마우스(IL-11RA1 KO 마우스)는 C57Bl/6 유전적 배경이 있었다. 마우스는 9-11주령이었고, 동물의 체중은 유의미하게 다르지 않았다.

[0361] IL-11/IL-11R 신호 전달 억제의 섬유증 억제적 효과를 추가적으로 확인하기 위해, 원발성 섬유아세포를 IL-11RA 유전자 녹아웃 마우스로부터 생성하고, TGF β 1, IL-11 또는 AngII와 함께, IL-11RA+/+ (즉, 야생형), IL-11RA+/- (즉, 이형 접합성 녹아웃) 및 IL-11RA-/- (동형 접합성 녹아웃) 동물로부터 채취한 원발성 섬유아세포와 배양하였다. 섬유아세포의 활성화 및 증식과 ECM 생산을 분석하였다.

[0362] IL-11RA+/+, IL-11RA+/- 및 IL-11RA-/- 마우스로부터 유래된 섬유아세포를 24시간 동안 TGF β 1, IL-11 또는 AngII(5 ng/ml)과 배양하였다. 배양 후, 근섬유아세포의 비율을 평가하기 위하여 α SMA 함량에 대해, 증식하는 세포의 비율을 확인하기 위하여 EdU에 대해, 그리고 ECM 생산을 추정하기 위하여 콜라겐 및 페리오스틴에 대해

세포를 염색하였다. 오페레타 플랫폼을 이용하여 형광을 측정하였다.

[0363] 결과를 도 25a 내지 도 25d에 나타내었다. IL-11RA^{-/-} 마우스는 섬유증 촉진 자극에 반응하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 IL-11 신호 전달이 AngII 유도성 섬유증에도 필요함을 시사한다.

[0364] 다음으로, 이것이 다른 섬유증 촉진 사이토카인에 대해서도 사실인지를 조사하였다.

[0365] 간략히 설명하자면, 여러 가지 상이한 섬유증 촉진 인자(ANG2, ET-1 또는 PDGF)의 존재/부재하에서, 그리고 중화 항 IL-11 항체 또는 pan 항-TGF β 항체의 존재/부재하에서, 섬유아세포를 시험관 내에서 배양하였다. 24시간 후, 상기 기술된 바와 같이 오페레타 시스템을 이용한 분석으로 세포에 의한 콜라겐 생산을 결정하였고, 위에 기술된 바와 같이 α SMA 발현 분석으로 근섬유아세포 생성을 결정하였다.

[0366] 결과를 도 26a 및 도 26b에 나타내었다. IL-11은 다양한 섬유증 촉진 자극의 하류에서 섬유증에 필요한 것으로 밝혀졌고, 따라서, 여러 가지 상이한 섬유증 촉진 인자에 의해 유도된 섬유증의 중심적인 매개인자로 확인되었다.

[0367] 추가적인 실험에서, 폐 섬유아세포 이동의 시험관 내 스크래치 검정법을 이용하여 IL-11 신호 전달의 역할을 폐 섬유증에서 조사하였다. 섬유증 촉진 자극에 반응하여, 섬유아세포는 활성화되고 신체의 섬유증 적소(fibrotic niche) 내에서 이동한다. 세포의 이동 속도는 세포-세포 및 세포-매트릭스 상호작용의 척도이자 생체 내 상처 치유 모델이다(Liang et al., 2007; Nat Protoc. 2(2):329-33).

[0368] 야생형(WT) 및 동형 접합성 IL-11RA^(-/-) 녹아웃 마우스의 폐 조직으로부터 유래된 섬유아세포를 그것들이 균 일한 세포 단일층을 형성할 때까지 플라스틱 표면 상에서 낮은 계대수로 성장시켰다. 그런 다음, 세포층에 스크래치를 생성시키고, 자극의 부재하에서 또는 TGF β 1 또는 IL-11의 존재하에서 스크래치로의 세포 이동을 관찰하였다. 스크래치 생성 및 24시간 후의 두 시점에서 포착된 이미지를 세포가 차지한 구역을 결정하는 데 이용하였고, WT 및 KO 섬유아세포 사이의 이동 속도를 비교하였다. 세포 이동(24시간 후 세포가 차지한 스크래치 내 구역)을 자극이 없는 WT 세포의 이동 속도에 대해 정규화하였다.

[0369] 결과를 도 40에 나타내었다. WT 마우스로부터 유래된 폐 섬유아세포는 TGF β 1 및 IL-11의 존재하에서 더 빠르게 이동하는 것으로 나타났으며, 이는 폐 섬유증에서의 두 사이토카인의 섬유증 촉진 효과를 나타낸다. KO 마우스로부터 유래된 IL-11 신호 전달이 결여된 세포는 WT 세포와 비교하여 더 천천히 이동하였다. 또한, 그것들은 TGF β 1의 존재하에서 더 빠르게 이동하지는 않았다. 스크래치 검정법은 IL-11 신호 전달이 결여된 폐 섬유아세포가 TGF β 1 또는 IL-11의 존재하에서와 기준선에서 모두 감소된 세포 이동 속도를 나타냄을 밝혔다. 따라서, IL-11 신호 전달의 억제는 폐에서 섬유증 억제적이다.

[0370] 7.2 심장 섬유증

[0371] 섬유증 장애 치료에 대한 IL-11 억제의 효능을 생체 내에서 조사하였다. 섬유증을 AngII 처리로 유도한 심장 섬유증 마우스 모델을 이용하여, IL-11RA^{-/-} 마우스가 심장 섬유증으로부터 보호되는지를 조사하였다.

[0372] 간략히 설명하자면, 펌프를 이식하고, 야생형(WT) IL-11RA^(+/+) 및 녹아웃 IL-11RA^(-/-) 마우스를 28일 동안 AngII(2 mg/kg/일)로 처리하였다. 실험 종료 시, 열량 측정식 하이드록시프롤린 기반 분석 키트를 이용하여 마우스의 심장에서 콜라겐 함량을 평가하고, 섬유증의 마커인 Col1A2, α SMA(ACTA2) 및 피브로넥틴(Fn1)의 RNA 발현 수준을 qPCR로 분석하였다.

[0373] 결과를 도 27a 내지 도 27d에 나타내었다. IL-11RA^{-/-} 마우스는 AngII의 섬유증 촉진 효과로부터 보호되는 것으로 나타났다.

[0374] 7.3 신장 섬유증

[0375] 야생형(WT) IL-11RA^(+/+) 및 녹아웃(KO) IL-11RA^(-/-) 마우스에서 비히클(0.3 M NaHCO₃) 중 염산(180 mg/kg)의 복강 내 주사에 의해 신장 섬유증 마우스 모델을 확립하였다. 대조군 마우스는 비히클만을 투여하였다. 주사 후 28일째에 신장을 제거하고, 중량을 측정하고, 이를 메이슨 트리크롬(Masson's trichrome) 염색 및 시리우스 염색을 위해 10% 중성 완충 포르말린에 고정시키거나, 콜라겐 분석, RNA 및 단백질 연구를 위해 급속 동결시켰다.

[0376] 트리졸 시약(인비트로젠(Invitrogen))과 퀴아젠(Qiagen) 티슈라이저(TissueLyzer) 방법에 이어, 알앤이지(RNeasy) 컬럼(퀴아젠) 정제를 이용하여 급속 동결된 신장으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 아이스크립트(iScriptTM) cDNA 합성 키트를 이용하여 cDNA를 제조하였으며, 이때 제조업체의 지시에 따라, 각각의 반응물은 총 RNA 1 μ g을 함유하였다. 40 사이클에 걸쳐 스탭원플러스(StepOnePlusTM, 어플라이드 바이오시스템(Applied

Biosystem))를 이용하여 타크만(TaqMan, 어플라이드 바이오시스템) 또는 신속 SYBR 그린(퀴아젠) 기술로 샘플을 삼반복(triplicate)으로 정량적 RT-PCR 유전자 발현 분석을 수행하였다. 발현 데이터를 GAPDH mRNA 발현 수준에 대해 정규화하고, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 배수 변화를 계산하였다. 급속 동결된 신장을 50 mg/ml의 농도의 6M HCl 중에서 가열하여(95℃, 20시간) 산 가수분해시켰다. 제조업체의 지시에 따라 퀵자임 총 콜라겐 분석 키트(퀵자임 바이오사이언스(Quickzyme Biosciences))를 이용하여 하이드록시프롤린의 비색 검출을 기반으로 가수 분해물 중 총 콜라겐의 양을 정량화하였다.

[0377] 분석 결과를 도 28에 나타내었다. 염산 유도성 신장 섬유증은 IL-11 매개성 신호 전달에 의존적인 것으로 나타났다. 신장 조직에서의 콜라겐 함량의 유의미한 증가가 IL-11RA^{+/+} 마우스에서 관찰되었으며, 이는 신장 섬유증을 나타낸다. IL-11RA^{-/-} 마우스에서는 어떠한 유의미한 콜라겐 함량 증가도 관찰되지 않았다. IL-11 신호 전달이 결여된 동물은 야생형 동물과 비교하여 독성 손상 후 신장에서 콜라겐 침착이 유의미하게 적었다.

[0378] 7.4 폐 섬유증

[0379] IL-11RA^{-/-} 녹아웃 마우스를 이용한 추가적인 생체 내 모델에서 IL-11이 폐, 피부 및 눈의 섬유증의 핵심 매개 인자로 확인되었다. 실험의 개략도를 도 29a 내지 도 29c에 나타내었다.

[0380] 폐 섬유증을 분석하기 위해, IL-11RA^{-/-} 마우스와 IL-11RA^{+/+} 마우스를 0일째에 블레오마이신을 기관 내 투여 처리하여, 폐에서의 섬유증 반응(폐 섬유증)을 확립하였다. 폐의 섬유증을 21일까지 발병시키고, 21일째에 동물을 희생시키고, IL-11 신호 전달이 있는 동물과 IL-11 신호 전달이 없는 동물 사이의 섬유증 마커의 차이에 대해 분석하였다. 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명된 바와 같이, IL-11RA^{-/-} 마우스는 IL-11RA^{+/+} 마우스와 비교하여 폐 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0381] 7.5 피부 섬유증

[0382] 피부의 섬유증을 분석하기 위해, IL-11RA^{-/-} 마우스와 IL-11RA^{+/+} 마우스를 0일째에 블레오마이신을 피하 투여 처리하여, 피부에서의 섬유증 반응을 확립하였다. 피부의 섬유증을 28일까지 발병시키고, 28일째에 동물을 희생시키고, IL-11 신호 전달이 있는 동물과 IL-11 신호 전달이 없는 동물 사이의 섬유증 마커 차이를 분석하였다. 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명된 바와 같이, IL-11RA^{-/-} 마우스는 IL-11RA^{+/+} 마우스와 비교하여 피부 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0383] 7.6 눈 섬유증

[0384] 눈의 섬유증을 분석하기 위해, 0일째에 IL-11RA^{-/-} 마우스와 IL-11RA^{+/+} 마우스에 섬유주절제술을 시행하여 눈에서 상처 치유 반응을 일으켰다. 눈의 섬유증은 7일 이내에 발병한다. 섬유증 반응을 측정하고, IL-11RA^{-/-} 마우스와 IL-11RA^{+/+} 마우스 사이에서 비교하였다. 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명된 바와 같이, IL-11RA^{-/-} 마우스는 IL-11RA^{+/+} 마우스와 비교하여 눈 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타낸다.

[0385] 7.7 기타 조직

[0386] 섬유증에 미치는 IL-11RA 녹아웃의 영향을 간, 장과 같은 다른 조직에 대한 섬유증의 마우스 모델에서도 분석하고, 다기관(즉, 전신성) 섬유증과 관련된 모델에서도 분석하였다. 섬유증 반응을 측정하고, IL-11RA^{-/-} 마우스와 IL-11RA^{+/+} 마우스 사이에서 비교하였다. 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명된 바와 같이, IL-11RA^{-/-} 마우스는 IL-11RA^{+/+} 마우스와 비교하여 감소된 섬유증 반응을 나타낸다.

[0387] 실시예 8: IL-11 매개성 섬유증 유도 기도의 기초가 되는 분자적 메커니즘 분석

[0388] IL-11의 전형적 작용 방식은 STAT3 매개성 전사(Zhu et al., 2015 PLoS ONE 10, e0126296) 및 ERK의 활성화를 통한 RNA 발현의 조절이라고 생각된다.

[0389] STAT3 활성화는 IL-11를 이용한 자극 후에 관찰된다. 그러나, 섬유아세포를 TGFβ1과 배양할 때, 전형적인 SMAD 경로 및 ERK 경로의 활성화만이 관찰되며, TGFβ1에 반응하여 IL-11이 분비된다는 사실에도 불구하고 STAT3의 활성화는 관찰되지 않는다. ERK 활성화만이 TGFβ1 및 IL-11 신호 전달 모두에 공통적이다.

[0390] TGFβ1과 IL-6 신호 전달 사이의 상호 간섭은 이전에 기술된 바 있는데, 여기에서 TGFβ1이 IL-6에 의한 STAT3의 활성화를 차단한다(Walia et al., 2003 FASEB J. 17, 2130-2132). IL-6과 IL-11 사이의 밀접한 관련성을 고려할 때, IL-11 매개성 신호 전달에 대해서 비슷한 상호 간섭이 관찰될 수 있다.

[0391] 본 발명자들은 RNA 존재(abundance)의 조절이 IL-11에 반응하여 섬유증 마커 단백질 발현이 증가되는 것의 기초

가 되는 메커니즘인지를 RNA-seq 분석으로 조사하였으며, 이는 STAT3이 IL-11 매개성 섬유증 촉진 과정을 위한 기초적인 신호 전달 경로임을 시사할 것이다. 섬유아세포를 자극 없이, 또는 TGFβ1, IL-11 또는 TGFβ1 및 IL-11의 존재하에서, 24시간 동안 배양하였다.

[0392] 결과를 도 30a에 나타내었다. TGFβ1은 RNA 수준에서 콜라겐, ACTA2(αSMA) 및 기타 섬유증 마커의 발현을 유도하였다. 그러나, IL-11은 이러한 유전자들의 발현을 조절하지 않았고, 다른 유전자 세트의 발현을 조절하였다.

[0393] 유전자 온톨로지 분석은 섬유아세포에서의 섬유증 촉진 효과가 IL-11 조절성 RNA 발현에 의해 유도됨을 시사한다. TGFβ1과 IL-11 둘 모두는 RNA 수준에서 거의 완전히 상이한 유전자 세트를 조절한다.

[0394] TGFβ1은 IL-11 분비를 증가시키는 반면, IL-11의 표적 유전자는 TGFβ1과 IL-11 모두가 존재할 때 조절되지 않는다. 이것은 TGFβ1이 IL-11을 상향 조절하고, 동시에 TGFβ1과 IL-6 경로의 상호 작용에 대하여 공지된 것(Walia et al., 2003 FASEB J. 17, 2130-2132)과 비슷하게, STAT3을 통한 전형적인 IL-11 유도성 RNA 발현 조절을 차단함을 시사한다.

[0395] 또한, 본 발명자들은 IL-11RA +/+ 마우스와 비교하여 IL-11RA -/- 마우스로부터 수득된 섬유아세포에서의 RNA 발현의 차이를 분석하여, TGFβ1에 의한 RNA 발현 차이가 IL-11 신호 전달에 의존하는지를 분석하였다. IL-11RA 녹아웃 세포를 TGFβ1으로 자극하였을 때 TGFβ1에 의해 조절된 RNA 발현이 여전히 관찰되었고, αSMA, 콜라겐 등의 RNA 수준은 IL-11 신호 전달의 부재하에서(IL-11RA -/- 섬유아세포에서) 여전히 상향 조절되었다. IL-11의 섬유증 촉진 효과 및 IL-11 억제의 섬유증 억제 효과를 시험관 내에서 조사하였을 때, qPCR로 결정된 바에 따르면 섬유증 마커의 감소된 발현은 단백질 수준에서만 관찰되었고, 전사 수준에서는 관찰되지 않았다.

[0396] 비-전형적인 경로(예를 들어, ERK 신호 전달)의 활성화는 TGFβ1의 섬유증 촉진 작용에 결정적이라고 알려져 있다(Guo and Wang, 2008 Cell Res 19, 71-88). 비-전형적인 경로는 모든 공지된 섬유증 촉진 사이토카인의 신호 전달에 중요할 가능성이 높고, IL-11은 섬유증에 필수적인 전사 후 조절 인자일 가능성이 높다.

[0397] 실시예 9: 인간 항 인간 IL-11 항체

[0398] 완전한 인간 항 인간 IL-11 항체를 파지 디스플레이를 통해 개발하였다.

[0399] 재조합 인간 IL-11(카탈로그 번호 Z03108-1)과 재조합 쥐(murine) IL-11(카탈로그 번호 Z03052-1)을 젠스크립트(GenScript, 미국 뉴저지 주)로부터 입수하였다. 재조합 인간 IL-11을 CHO 세포에서 Fc 태그를 붙인 버전과 태그 없는 버전으로 발현시켰다. 태그가 없는 쥐 IL-11을 HEK293 세포에서 발현시켰다.

[0400] 재조합 인간 IL-11과 마우스 IL-11의 IL-11 생물활성을 원발성 섬유아세포 배양물을 이용한 시험관 내 분석으로 확인하였다.

[0401] 또한, 표준적인 방법에 따라 재조합 인간 IL-11 및 쥐 IL-11 분자의 비오틴화에 의해 재조합 비오틴화 인간 IL-11과 쥐 IL-11을 제조하였다.

[0402] 16가지의 상이한 패닝 전략을 기초로 한, 비오틴 부착 및 비오틴 비 부착 재조합 인간 및 쥐 IL-11을 이용한 패닝에 의해, 인간 비감작(naive) 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이에 의해 인간 IL-11과 쥐 IL-11 둘 다에 결합할 수 있는 항체(즉, 교차 반응성 항체)를 확인하였다.

[0403] 파지 디스플레이는 175개의 scFv 바인더를 '1차 히트(first hit)'로 확인하였다. 이들 175개 scFv로부터의 CDR 서열의 서열 분석으로 86개의 독특한 scFv를 확인하였다.

[0404] 가용성 scFv를 대장균에서의 재조합 발현으로 생산하고, ELISA로 인간 IL-11 및 쥐 IL-11에 결합하는 그것들의 능력을 분석하였다. 간략히 설명하자면, 각각의 항원을 ELISA 플레이트의 웰에 코팅하고, 각각의 scFv를 함유하는 세포 배양물 상층액을 1:2 희석으로 첨가하고, 결합을 검출하였다.

[0405] ELISA 분석 결과는 다음과 같이 나타났다:

[0406] · 인간 IL-11에만 결합할 수 있는 8개의 scFv;

[0407] · 쥐 IL-11에만 결합할 수 있는 6개의 scFv;

[0408] · 높은 신호 대 잡음비로 인간/쥐 IL-11에 대해 약한 결합만을 나타내는 32개의 scFv, 및;

[0409] · 인간 IL-11 및 쥐 IL-11 둘 다에 대해 교차 반응성을 나타내는 40개 scFv.

[0410] 이들 86개 scFv로부터의 추가적인 기능적 특성 분석을 위해 56개의 후보를 선택하였다. 추가적인 분석을 위해,

scFV를 대장균에서 scFV-Fc 포맷으로 클로닝하였다.

[0411] scFv-Fc(인간 IgG1) 항체의 생성을 위해 항체의 VH 및 VL 서열을 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 무혈청 배지에 서 배양한 포유동물 세포에서 벡터를 일시적으로 발현시키고, 단백질 A 정제로 분리하였다.

[0412] **실시예 10: 인간 항 인간 IL-11 항체의 기능적 특성 분석**

[0413] 실시예 9에 기술된 항체를 (i) 인간 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하고, (ii) 마우스 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 항체의 능력에 대해 시험관 내 검정법으로 분석하였다. 인간 IL-11에 대한 항체의 친화도 또한 ELISA로 분석하였다.

[0414] **10.1 인간 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 능력**

[0415] 인간 IL-11 매개성 신호 전달을 중화하는 능력을 조사하기 위해, 심장 심방 인간 섬유아세포를 24시간 동안 TGF β 1(5 ng/ml)의 존재하에서, 항 IL-11 항체의 존재 또는 부재하에서, 96웰 플레이트의 웰에 배양하였다. TGF β 1은 IL-11의 발현을 촉진하고, 이는 결국 휴지기의 섬유아세포의 활성화된 α SMA-양성 섬유아세포로의 전이를 유도한다. 중화 IL-11은 활성화된 α SMA-양성 섬유아세포로의 TGF β 1 유도성 전이를 억제한다는 점은 이전에 밝혀진 바 있다.

[0416] α SMA의 발현을 오페레타 고함량 영상화 시스템을 이용한 자동화된 고속 처리 방식으로 분석하였다.

[0417] 자극되지 않은 배양물에서, 24시간 배양 기간 종료 시에 약 29.7%(=1)의 섬유아세포가 α SMA-양성의 활성화된 섬유아세포였던 반면, 항-IL-11 항체 부재 하에서 TGF β 1으로 자극된 배양물에서는 약 52%(= 1.81)의 섬유아세포가 α SMA-양성이었다.

[0418] 항-IL-11 항체(2 μ g/ml)를 TGF β 1으로 자극된 섬유아세포 배양물에 첨가하고, 24시간의 배양 기간 종료 시, α SMA-양성 섬유아세포의 백분율을 결정하였다. 백분율을, TGF β 1으로 자극되지 않았던 섬유아세포의 배양물에서 관찰된 α SMA-양성 섬유아세포의 백분율을 기반으로 정규화하였다.

[0419] 항체 중 28개가 인간 IL-11에 의해 매개된 신호를 중화할 수 있는 것으로 나타났다.

[0420] 또한, 상업적인 단일클론 마우스 항 IL-11 항체(단일클론 마우스 IgG2A; 클론 #22626; 카탈로그 번호 MAB218; 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타 주)를 대상으로 실험에서 인간 IL-11에 의한 신호 전달을 억제할 수 있는 능력에 대해 분석하였다. 이 항체는 활성화된 섬유아세포의 백분율을 28.3%(=0.99)까지 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

[0421] 몇몇 클론은 상업적으로 이용 가능한 마우스 항 IL-11 항체(산업 표준)보다 더 큰 정도로 인간 IL-11에 의한 신호 전달을 중화하였다.

[0422] **10.2 마우스 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 능력**

[0423] 위의 섹션 10.1에 기술된 것과 동일한 절차를 따라, 그러나 인간 심방 섬유아세포 대신 마우스 피부 섬유아세포를 이용하여, 마우스 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 인간 항체의 능력도 조사하였다.

[0424] 배양 24시간 후, 배양물 중 자극되지 않은 세포의 약 31.8%(=1)는 활성화된 섬유아세포였다. TGF β 1로의 자극은 자극되지 않은 배양물과 비교하여 활성화된 섬유아세포 백분율의 약 2배의 증가(68.8% = 2.16)를 가져왔다.

[0425] 항체들은 마우스 IL-11에 의해 매개된 신호 전달을 중화할 수 있는 것으로 나타났다. 또한, 단일클론 마우스 IgG2A 클론 #22626, 카탈로그 번호 MAB218 항-IL-11 항체를 대상으로 마우스 IL-11에 의한 신호 전달을 억제할 수 있는 능력에 대해 분석하였다. 이 항체는 활성화된 섬유아세포의 백분율을 39.4%(=1.24)까지 감소시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0426] 몇몇 클론은 상업적으로 이용 가능한 마우스 항 IL-11 항체(산업 표준)보다 더 큰 정도로 마우스 IL-11에 의한 신호 전달을 중화하였다.

[0427] **10.3 인간 IL-11에 대한 항체 친화도 분석**

[0428] 인간 항 인간 IL-11 항체를 대상으로 ELISA 검정법으로 인간 IL-11에 대한 결합 친화력을 분석하였다.

[0429] 재조합 인간 IL-11은 젠스크립트로부터 입수하였고, 호스레이쉬 퍼옥시다제(HRP)가 접합된 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체는 시그마(Sigma)로부터 입수하였다. 코닝(Corning) 96웰 ELISA 플레이트는 시그마로부터 입수하였다. 피어스(Pierce) 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) ELISA 매트릭스 키트는 라이프 테크놀로지스

(Life Technologies)로부터 입수하였다(0.4 g/mL TMB 용액, 시트르산 완충액 중 0.02 % 과산화수소). 소 혈청 알부민과 황산은 시그마로부터 입수하였다. 세척 완충액은 인산 완충 식염수 중 0.05% 트윈(Tween)-20으로 구성하였다(PBS-T). ScFv-Fc 항체는 상기 기술된 바와 같이 생성하였다. 정제된 마우스 및 인간 IgG 대조군은 라이프 테크놀로지스로부터 구입하였다. 테칸 인피니트 200 프로 나노퀀트(Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant)를 흡광도를 측정하는 데 사용하였다.

[0430] 문헌[Hornbeck et al., (2015) Curr Protoc Immunol 110, 2.1.1-23]에 기술된 바와 같이 십자형 단계회석 분석을 수행하여 코팅 항원, 1차 항체 및 2차 항체의 최적 농도를 결정하였다.

[0431] 이전에 기술된 바와 같이(Unverdorben et al., (2016) MAbs 8, 120-128.), 간접적 ELISA를 수행하여 50%의 유효 농도(EC₅₀)에서 1차 ScFv-Fc 항체의 결합 친화력을 평가하였다. ELISA 플레이트를 4℃에서 밤새 제조합 인간 IL-11 1 μg/mL로 코팅하고, 남아 있는 결합 부위를 PBS 중 2% BSA로 차단하였다. ScFv-Fc 항체를 PBS 중 1% BSA로 희석하고, 적정하여 800, 200, 50, 12.5, 3.125, 0.78, 0.195, 및 0.049 ng/mL의 작용 농도를 획득하였고, 실온에서 2시간 동안 2반복으로(in duplicates) 배양하였다. 15.625 ng/mL의 HRP가 접합된 항-인간 IgG(Fc-특이적) 항체로 항원-항체 결합의 검출을 수행하였다. 검출 항체와의 2시간의 배양 후, 100 μl의 TMB 매트릭스를 15분 동안 첨가하고, 발색 반응을 2 M H₂SO₄ 100 μl로 정지시켰다. 흡광도 판독은 570 nm에서의 기준 파장 보정을 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 데이터는 항체 농도를 로그 변환하여 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어로 적합화하고, 비대칭(5개 매개변수) 로지스틱 용량-반응 곡선으로 비 선형 회귀 분석을 수행하여 개별적인 EC₅₀ 값을 결정하였다.

[0432] 위에 기술된 것과 동일한 재료와 절차를 수행하여 쥐와 단일클론 항 IL-11 항체의 결합 친화력을 결정하되, HRP가 접합된 항-인간 IgG 대신 HRP가 접합된 항-마우스 IgG(H&L)를 사용하였다.

[0433] 위에 기술된 것과 동일한 재료와 절차를 수행하여 젠스크립트로부터 입수한 제조합 쥐와 IL-11에 대한 인간 단일클론 항 IL-11 항체 및 쥐와 단일클론 항 IL-11 항체의 결합 친화력을 결정하였다.

[0434] ELISA 분석 결과를 이용하여 항체에 대한 EC₅₀ 값을 결정하였다.

[0435] 10.4 다양한 조직에서 인간 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 능력

[0436] 심장 심방 인간 섬유아세포 대신, 간, 폐, 신장, 눈, 피부, 췌장, 비장, 장, 뇌 및 골수로부터 유래된 인간 섬유아세포를 실험에 이용하였다는 점을 제외하고는 기본적으로 섹션 10.1에 기술된 바에 따라, 여러 가지 상이한 조직으로부터 수득된 섬유아세포에서 IL-11 매개성 신호 전달을 중화하는 항체의 능력을 조사하였다.

[0437] 항체 부재하에서의 배양과 비교하여 항 IL-11 항체의 존재하에서 24시간의 배양 기간의 종료 시, α SMA-양성 섬유아세포의 비율의 상대적인 감소를 관찰하여 측정한 바에 따르면, 항-IL-11 항체는 여러 가지 상이한 조직으로부터 유래된 섬유아세포에서 신호 전달을 중화할 수 있는 것으로 증명되었다.

[0438] 실시예 11: 항 IL-11 항체를 이용한 생체 내에서의 섬유증의 억제

[0439] 항 인간 IL-11 항체의 치료적 유용성을 여러 가지 상이한 조직에 대한 섬유증의 생체 내 마우스 모델에서 증명하였다.

[0440] 11.1 심장 섬유증

[0441] 펌프를 이식하고, 28일 동안 마우스에 AngII(2 mg/kg/일)를 처리하였다.

[0442] 중화 항 IL-11 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 실험 종료 시, 열량 측정식 하이드록시프롤린 기반 분석 키트를 이용하여 마우스의 심방에서 콜라겐 함량을 평가하고, 섬유증 마커인 Col1A2, α SMA(ACTA2) 및 피브로넥틴(Fn1)의 RNA 발현 수준을 qPCR로 분석하였다.

[0443] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 심장 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0444] 11.2 신장 섬유증

[0445] 신장 섬유증의 마우스 모델을 확립하였으며, 여기에서 섬유증은 비히클(0.3 M NaHCO₃) 중 엽산(180 mg/kg)의 복강 내 주사에 의해 유도하였다. 대조군 마우스는 비히클만을 투여하였다.

- [0446] 중화 항 IL-11 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 28일째에 신장을 제거하고, 중량을 측정하고, 이를 메이슨 트리크롬 염색 및 시리우스 염색을 위해 10% 중성 완충 포르말린 중에 고정시키거나 콜라겐 분석, RNA 및 단백질 연구를 위해 급속 동결시켰다.
- [0447] 트리폴 시약(인비트로젠)과 퀴아젠 티슈라이저 방법에 이어, 알앤이지 컬럼(퀴아젠) 정제를 이용하여 급속 동결된 신장으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 아이스크립트(iScript™) cDNA 합성 키트를 이용하여 cDNA를 제조하였으며, 여기에서 제조업체의 지시에 따라, 각각의 반응물은 총 RNA 1 µg을 함유하였다. 40 사이클에 걸쳐 스텝 원플러스(StepOnePlus™, 어플라이드 바이오시스템)를 이용하여 타크만(TaqMan, 어플라이드 바이오시스템) 또는 신속 SYBR 그린(퀴아젠) 기술로 샘플을 삼반복으로 정량적 RT-PCR 유전자 발현 분석을 수행하였다. 발현 데이터를 GAPDH mRNA 발현 수준에 대해 정규화하고, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 배수 변화를 계산하였다. 급속 동결된 신장을 50 mg/ml의 농도의 6M HCl 중에서 가열하여(95℃, 20시간) 산 가수분해시켰다. 제조업체의 지시에 따라, 퀵자임 총 콜라겐 분석 키트(퀵자임 바이오사이언스)를 이용하여 하이드록시프롤린의 비색 검출을 기반으로 가수분해물 중 총 콜라겐의 양을 정량화하였다.
- [0448] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 신장 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0449] 11.3 폐 섬유증
- [0450] 0일째에 마우스에 블레오마이신을 기관 내 투여 처리하여 폐에서의 섬유증 반응(폐 섬유증)을 확립하였다.
- [0451] 중화 항 IL-11 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 21일째에 마우스를 희생시켜, 섬유증 마커의 차이를 분석하였다.
- [0452] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 폐 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0453] 11.4 피부 섬유증
- [0454] 0일째에 마우스에 블레오마이신을 피하 투여 처리하여 피부에서의 섬유증 반응을 확립하였다.
- [0455] 중화 항 IL-11 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 21일에 마우스를 희생시켜, 섬유증 마커의 차이를 분석하였다.
- [0456] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 피부 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0457] 11.5 눈 섬유증
- [0458] 0일째에 마우스에 섬유주절제술을 시행하여 눈에서 상처 치유 반응을 일으켰다.
- [0459] 중화 항 IL-11 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하고, 눈 조직에서 섬유증을 관찰하였다.
- [0460] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 눈 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0461] 11.6 기타 조직
- [0462] 섬유증에 미치는 중화 항 IL-11 항체 처리의 영향을 간, 신장, 장과 같은 다른 조직에 대한 섬유증의 마우스 모델에서도 분석하고, 다기관(즉, 전신성) 섬유증과 관련된 모델에서도 분석하였다.
- [0463] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0464] 실시예 12: 항-인간 IL-11R α 항체
- [0465] 인간 IL-11R α 단백질에 대한 마우스 단일클론 항체를 다음과 같이 생성하였다.
- [0466] 인간 IL-11R α 에 대한 아미노산을 암호화하는 cDNA를 발현 플라스미드(알데브론(Aldebron) GmbH, 독일 프라이부르크)에 클로닝하였다.
- [0467] 유전자 총법(particle-bombardment)("유전자 총(gene gun)")을 위한 소형 장치를 이용하여 DNA가 코팅된 금 입

자를 피내(intraderal) 적용시켜 마우스를 면역화하였다. 일련의 면역화 후 마우스로부터 혈청 샘플을 수집하고, 인간 IL-11R 발현 플라스미드로 일시적으로 형질감염시킨 HEK 세포에서 유세포 검정법으로 시험하였다(일시적으로 형질감염시킨 HEK 세포에 의한 인간 IL-11R α 의 세포 표면 발현은 IL-11R α 단백질의 N 말단에 부가된 태그를 인식하는 항-태그 항체로 확인하였다).

[0468] 마우스로부터 항체를 생산하는 세포를 분리하고, 일반적인 절차에 따라 마우스 골수종 세포(Ag8)와 융합시켰다.

[0469] 유세포 검정법에 의해 IL-11R α 를 발현하는 HEK 세포에 대한 결합 능력을 스크리닝하여 IL-11R α 에 특이적인 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하였다.

[0470] RNA 보호제(RNA레이터(RNAlater), 카탈로그 #AM7020, 써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)를 이용하여 양성 하이브리도마 세포의 세포 펠릿을 제조하고, 항체의 가변 도메인의 시퀀싱을 위해 추가로 프로세싱하였다.

[0471] 제조업체의 지시에 따라 빅다이(BigDye®) 터미네이터 v3.1 사이클 시퀀싱 키트(라이프 테크놀로지스)를 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. 3730x1 DNA 분석기 시스템 및 유니파이드 데이터 수집(Unified Data Collection) 소프트웨어(라이프 테크놀로지스)를 이용하여 모든 데이터를 수집하였다. 코돈코드 얼라이너(CodonCode Aligner, 코돈코드 코퍼레이션(CodonCode Corporation))를 이용하여 서열 조립을 수행하였다. 혼합 염기 콜(mixed base call)은 가장 보편적인 염기 콜을 혼합 염기 콜에 자동으로 지정하여 해결하였다. 염기 콜의 빈도 및 염기 콜의 개별적인 품질에 의해 보편도(prevalence)를 결정하였다.

[0472] 총 17개의 마우스 단일클론 항 인간 IL-11R α 항체 클론이 생성되었다.

[0473] **실시예 13: 항 인간 IL-11R α 항체의 기능적 특성 분석**

[0474] 13.1 인간 IL-11/IL-11R 매개성 신호 전달을 억제하는 능력

[0475] 인간 IL-11/IL-11R 매개성 신호 전달을 중화하는 항 IL-11R α 항체의 능력을 조사하기 위해, 심장 심방 인간 섬유아세포를 24시간 동안 TGF β 1(5 ng/ml)의 존재하에서, 항 IL-11R α 항체의 존재 또는 부재 하에서, 96웰 플레이트의 웰에 배양하였다. 이 섬유증 촉진 자극은 IL-11의 발현을 촉진하고, 이는 결국 휴지기의 섬유아세포의 활성화된 α SMA-양성 섬유아세포로의 전이를 유도한다. 중화 IL-11이 활성화된 α SMA-양성 섬유아세포로의 TGF β 1 유도성 전이를 방지한다는 점은 이전에 밝혀진 바 있다.

[0476] 항 IL-11R α 항체(2 μ g/ml)를 TGF β 1으로 자극된 섬유아세포 배양물에 첨가하고, 24시간의 배양 기간 종료 시, α SMA-양성 섬유아세포의 백분율을 결정하였다. 백분율을, TGF β 1으로 자극되지 않았던 섬유아세포의 배양물에서 관찰된 α SMA-양성 섬유아세포의 백분율을 기반으로 정규화하였다.

[0477] α SMA의 발현을 오페레타 고품량 영상화 시스템으로 자동화된 고속 처리 방식으로 분석하였다.

[0478] TGF β 1으로의 자극은 항 IL-11R α 항체 부재하에서 24시간 배양 기간의 종료 시 α SMA-양성의, 활성화된 섬유아세포 수의 1.58배 증가를 초래하였다.

[0479] 상업적인 단일클론 마우스 항 IL-11 항체(단일클론 마우스 IgG2A; 클론 #22626; 카탈로그 번호 MAB218; 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타 주)를 대조군으로 포함시켰다. 이 항체는 활성화된 섬유아세포의 백분율을 자극되지 않은 배양물에서(즉, TGF β 1을 이용한 자극의 부재하에서) 활성화된 섬유아세포의 백분율의 0.89배까지 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

[0480] 항 IL-11R α 항체는 인간 섬유아세포에서 IL-11/IL-11R 신호 전달을 억제할 수 있는 것으로 밝혀졌고, 몇몇은 단일클론 마우스 항 IL-11 항체보다 더 큰 정도로 IL-11/IL-11R 신호 전달을 억제할 수 있었다.

[0481] 13.2 마우스 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 능력

[0482] 위의 섹션 13.1에 기술된 것과 동일한 절차를 따라, 그러나 인간 심방 섬유아세포 대신 마우스 심방 섬유아세포를 이용하여, 마우스 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 항 IL-11R α 항체의 능력을 또한 조사하였다.

[0483] TGF β 1로의 자극은 항 IL-11R α 항체의 부재하에 24시간 배양 기간의 종료 시에 α SMA-양성의, 활성화된 섬유아세포 수의 2.24배 증가를 가져왔다.

[0484] 상업적인 단일클론 마우스 항 IL-11 항체(단일클론 마우스 IgG2A; 클론 #22626; 카탈로그 번호 MAB218; 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타 주)를 대조군으로 포함시켰다. 이 항체는 활성화된 섬유아세포의 백분율을 자극되지 않은 배양물에서(즉, TGF β 1을 이용한 자극의 부재하에서) 활성화된 섬유아세포의 백분율의 1.44배까지 감소시

킬 수 있는 것으로 나타났다.

- [0485] 항 IL-11R α 항체는 마우스 섬유아세포에서 IL-11/IL-11R 신호 전달을 억제할 수 있는 것으로 밝혀졌고, 몇몇은 단일클론 마우스 항-IL-11 항체보다 더 큰 정도로 IL-11/IL-11R 신호 전달을 억제할 수 있었다.
- [0486] 13.3 IL-11R α 에 결합하는 능력에 대한 스크리닝
- [0487] 항 인간 IL-11R α 항체를 생산하는 마우스 하이브리도마를 서브클로닝하고, 서브클로닝된 하이브리도마로부터 세포 배양물 상층액을 대상으로 (i) 인간 IL-11R α 에 결합하는 능력 및 (ii) IL-11R α 이외의 항원에 대한 교차 반응성을 "혼합 및 측정(mix-and-measure)" 아이큐(iQue) 검정법으로 분석하였다.
- [0488] 간략히 설명하자면, (세포 표면에서 IL-11R α 를 발현하지 않는) 표지된 대조군 세포와 (FLAG 태그가 붙은 인간 IL-11R α 를 암호화하는 플라스미드로의 일시적인 형질감염 후에) 표면에서 인간 IL-11R α 를 발현하는 표지되지 않은 표적 세포를 (마우스 항 IL-11R α 항체를 함유하는) 세포 배양물 상층액 및 2차 검출 항체(형광 표지된 항-마우스 IgG 항체)와 혼합하였다.
- [0489] 그런 다음, HTFC 스크리닝 시스템(iQue)을 이용하여 세포를 대상으로 두 가지 표지(즉, 세포 표지 및 2차 항체 상의 표지)를 분석하였다. 표지되지 않은, IL-11R α 를 발현하는 세포 상에서의 2차 항체의 검출은 IL-11R α 에 결합하는 마우스 항 IL-11R α 항체의 능력을 보여주었다. 표지된, 대조군 세포 상의 2차 항체의 검출은 IL-11R α 이외의 표적에 대한 마우스-항-IL-11R α 항체의 교차 반응성을 보여주었다.
- [0490] 양성 대조군 조건으로, 표지된 세포와 표지되지 않은 세포를 1차 항체로서 마우스 항-FLAG 태그 항체와 함께 배양하였다.
- [0491] 서브클로닝된 하이브리도마의 대부분은 인간 IL-11R α 에 결합할 수 있으며, 이 표적을 높은 특이성으로 인식하는 항체를 발현하였다.
- [0492] 13.4 인간 IL-11R α 에 대한 항체 친화도 분석
- [0493] 항-인간 IL-11R α 항체를 대상으로 ELISA 검정법으로 인간 IL-11R α 에 대한 결합 친화도를 분석하였다.
- [0494] 제조한 인간 IL-11R α 는 젠스크립트로부터 입수하였고, 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)가 접합된 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체는 시그마로부터 입수하였다. 코닝 96웰 ELISA 플레이트는 시그마로부터 입수하였다. 피어스 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) ELISA 매트릭스 키트는 라이프 테크놀로지스로부터 입수하였다(0.4 g/mL TMB 용액, 시트란 완충액 중 0.02 % 과산화수소). 소 혈청 알부민과 황산은 시그마로부터 입수하였다. 세척 완충액은 인산 완충 식염수 중 0.05% 트윈(Tween)-20으로 구성하였다(PBS-T). 정제된 IgG 대조군은 라이프 테크놀로지스에서 구입하였다. 테칸 인피니트 200 프로 나노퀀트를 흡광도를 측정하는 데 사용하였다.
- [0495] 문헌[Hornbeck et al., (2015) Curr Protoc Immunol 110, 2.1.1-23]에 기술된 바와 같이 십자형 단계희석 분석을 수행하여 코팅 항원, 1차 항체 및 2차 항체의 최적 농도를 결정하였다.
- [0496] 이전에 기술된 바와 같이(Unverdorben et al., (2016) MAbs 8, 120-128.), 간접적 ELISA를 수행하여 50%의 유효 농도(EC₅₀)에서 마우스 항 IL-11R α 항체의 결합 친화력을 평가하였다. ELISA 플레이트를 4°C에서 밤새 재조합 인간 IL-11R α 1 μ g/mL으로 코팅하고, 남아 있는 결합 부위를 PBS 중 2% BSA로 차단하였다. 항체를 PBS 중 1% BSA로 희석하고, 적정하여 800, 200, 50, 12.5, 3.125, 0.78, 0.195, 및 0.049 ng/mL의 작용 농도를 수득하였고, 실온에서 2시간 동안 2반복으로 배양하였다. 15.625 ng/mL의 HRP가 접합된 항-인간 IgG 항체로 항원-항체 결합의 검출을 수행하였다. 검출 항체와의 2시간의 배양 후, 100 μ l의 TMB 매트릭스를 15분 동안 첨가하고, 발색 반응을 2 M H₂SO₄ 100 μ l로 정지시켰다. 흡광도 판독은 570 nm에서의 기준 파장 보정을 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 데이터는 항체 농도를 로그 변환하여 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 적합화하고, 비대칭(5개 매개변수) 로지스틱 용량-반응 곡선으로 비 선형 회귀 분석을 수행하여 개별적인 EC₅₀ 값을 결정하였다.
- [0497] 13.5 다양한 조직에서 인간 IL-11/IL-11R 신호 전달을 억제하는 능력
- [0498] 심장 심방 인간 섬유아세포 대신, 간, 폐, 신장, 눈, 피부, 췌장, 비장, 장, 뇌 및 골수로부터 유래된 인간 섬유아세포를 실험에 이용하였다는 점을 제외하고, 기본적으로 섹션 13.1에 기술된 바에 따라 여러 가지 상이한 조직으로부터 수득된 섬유아세포에서 IL-11/IL-11R 신호 전달을 증화하는 항체의 능력을 조사하였다.
- [0499] 항체 부재하에서의 배양과 비교하여 항 IL-11 α 항체의 존재하에서 24시간의 배양 기간의 종료 시, α SMA-양성 섬유아세포의 비율의 상대적인 감소를 관찰하여 결정한 바에 따르면, 항 IL-11 α 항체는 여러 가지 상이한 조직

으로부터 유래된 섬유아세포에서 IL-11/IL-11R 신호 전달을 중화할 수 있는 것으로 증명되었다.

[0500] **실시예 14: 항 IL-11R α 항체를 이용한 생체 내에서의 섬유증 억제**

[0501] 항 인간 IL-11R α 항체의 치료적 유용성을 여러 가지 상이한 조직에 대한 섬유증의 생체 내 마우스 모델에서 증명하였다.

[0502] 14.1 심장 섬유증

[0503] 펌프를 이식하고, 28일 동안 마우스에 AngII(2 mg/kg/일)를 처리하였다.

[0504] 중화 항 IL-11R α 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 실험 종료 시, 열량 측정식 하이드록시프롤린 기반 분석 키트를 이용하여 마우스의 심방에서 콜라겐 함량을 평가하고, 섬유증 마커인 Col1A2, α SMA(ACTA2) 및 피브로넥틴(Fn1)의 RNA 발현 수준을 qPCR로 분석하였다.

[0505] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11R α 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 심장 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0506] 14.2 신장 섬유증

[0507] 신장 섬유증의 마우스 모델을 확립하였으며, 섬유증은 비히클(0.3 M NaHCO₃) 중 염산(180 mg/kg)의 복강 내 주사에 의해 유도하였다. 대조군 마우스는 비히클만을 투여하였다.

[0508] 중화 항 IL-11R α 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 28일째에 신장을 제거하여 중량을 측정하였고, 이를 메이슨 트리크롬 염색 및 시리우스 염색을 위해 10% 중성 완충 포르말린 중에 고정시키거나 콜라겐 분석, RNA 및 단백질 연구를 위해 급속 동결시켰다.

[0509] 트리졸 시약(인비트로젠)과 퀴아젠 티슈라이저 방법에 이어, 알앤이지 컬럼(퀴아젠) 정제를 이용하여 급속 동결된 신장으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 아이스크립트(iScript™) cDNA 합성 키트를 이용하여 cDNA를 제조하였으며, 제조업체의 지시에 따라, 각각의 반응물은 총 RNA 1 μ g을 함유하였다. 40 사이클에 걸쳐 스텝원플러스(StepOnePlus™, 어플라이드 바이오시스템)를 이용하여 타크만(TaqMan, 어플라이드 바이오시스템) 또는 신속 SYBR 그린(퀴아젠) 기술로 샘플에 대해 삼반복으로 정량적 RT-PCR 유전자 발현 분석을 수행하였다. 발현 데이터를 GAPDH mRNA 발현 수준에 대해 정규화하고, 2- $\Delta\Delta$ Ct 방법을 이용하여 배수 변화를 계산하였다. 급속 동결된 신장을 50 mg/ml의 농도의 6M HCl 중에서 가열하여(95°C, 20시간) 산 가수분해시켰다. 제조업체의 지시에 따라 퀵자임 총 콜라겐 분석 키트(퀵자임 바이오사이언스)를 이용하여 하이드록시프롤린의 비색 검출을 기반으로 가수분해물 중 총 콜라겐의 양을 정량화하였다.

[0510] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11R α 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 신장 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0511] 14.3 폐 섬유증

[0512] 0일째에 마우스에 블레오마이신을 기관 내 투여 처리하여 폐에서의 섬유증 반응(폐 섬유증)을 확립하였다.

[0513] 중화 항 IL-11R α 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 21일째에 마우스를 희생시켜, 섬유증 마커의 차이를 분석하였다.

[0514] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11R α 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 폐 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0515] 14.4 피부 섬유증

[0516] 0일째에 마우스에 블레오마이신을 피하 투여 처리하여 피부에서의 섬유증 반응을 확립하였다.

[0517] 중화 항 IL-11R α 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 21일째에 마우스를 희생시켜, 섬유증 마커의 차이를 분석하였다.

[0518] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11R α 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 피부 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0519] 14.5 눈 섬유증

- [0520] 0일째에 마우스에 섬유주절제술을 시행하여 눈에서 상처 치유 반응을 일으켰다.
- [0521] 중화 항IL-11R α 항체, 또는 대조 항체를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하고, 눈 조직에서 섬유증을 관찰하였다.
- [0522] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11R α 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 눈 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0523] 14.6 기타 조직
- [0524] 섬유증에 미치는 중화 항 IL-11R α 항체 처리의 영향을 간, 신장, 장과 같은 다른 조직에 대한 섬유증의 마우스 모델에서도 분석하고, 다기관(즉, 전신성) 섬유증과 관련된 모델에서도 분석하였다.
- [0525] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 중화 항 IL-11R α 항체 처리된 마우스는 대조 항체 처리된 마우스와 비교하여 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0526] **실시예 15: 유인 IL-11 수용체**
- [0527] 15.1 유인 IL-11 수용체 구조체
- [0528] 유인 IL-11 수용체 분자를 설계하고, 293-6E 세포에서의 재조합 발현을 위해 pTT5 벡터로 클로닝하였다.
- [0529] 간략히 설명하자면, 플라스미드를 위한 삽입체는 50개 아미노산 또는 33개 아미노산 링커 영역을 암호화하는 cDNA를 가지는 구성(in-frame)으로 gp130의 리간드 결합 도메인인 D1, D2 및 D3을 암호화하는 cDNA, 다음으로 인간 IL-11R α 의 리간드 결합 도메인인 D2 및 D3을 암호화하는 cDNA, 다음으로 FLAG 태그를 암호화하는 cDNA를 포함한다. cDNA 삽입체는 리더 서열, 5' 말단에 코작(Kozak) 서열을 포함하였고, pTT5 벡터 내로의 삽입을 위해 5' EcoRI 제한 부위 및 3' HindIII 제한 부위(정지 코돈의 하류)를 포함하였다.
- [0530] 50개 아미노산 또는 33개 아미노산 서열을 가지고 있는 유인 IL-11 수용체 분자를 암호화하는 두 개의 구조체는 각각 유인 IL-11 수용체 1(D11R1)과 유인 IL-11 수용체 2(D11R2)로 지칭하였다.
- [0531] 15.2 유인 IL-11 수용체 발현 및 정제
- [0532] 재조합 발현 및 정제를 위해 구조체를 293-6E 세포 내로 형질감염시켰다.
- [0533] 293-6E 세포를 무혈청 프리스타일(FreeStyleTM) 293 발현 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아 주 칼즈배드)에서 성장시켰다. 세포를 레도 진탕기(VWR 사이언티픽(Scientific), 미국 펜실베이니아 주 체스터)에서 5% CO₂와 37℃에서 에를렌마이어 플라스크(코닝 주식회사, 미국 매사추세츠 주 액턴)에 유지시켰다.
- [0534] 형질감염 하루 전, 세포를 코닝 에를렌마이어 플라스크에 적합한 밀도로 씨딩하였다. 형질감염 당일, DNA와 형질감염 시약을 최적 비율로 혼합한 다음, 형질감염 준비가 된 세포가 들어 있는 플라스크에 첨가하였다. D11R1 및 D11R2를 암호화하는 재조합 플라스미드를 이틀에 걸쳐 현탁액 293-6E 세포 배양물에 일시적으로 형질감염시켰다.
- [0535] 6일째에 세포 배양물 상층액을 수집하고 정제에 사용하였다. 간략히 설명하자면, 세포 배양액을 원심분리하고 여과하였다. 수지 0.5 ml을 세포 배양물 상층액에 첨가하고, 표적 단백질을 포획하기 위해 3-4시간 동안 배양하였다.
- [0536] 적합한 완충액으로 세척 및 용출시킨 후, 용출된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 토끼 항-FLAG 다클론 Ab(젠스크립트, 카탈로그 번호 A00170)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하여 FLAG 태그가 붙은 유인 IL-11 수용체 분자의 발현을 확인하였다.
- [0537] 정제된 중을 정량화하고, -80℃에 보관하였다.
- [0538] **실시예 16: 유인 IL-11 수용체의 기능적 특성 분석**
- [0539] 16.1 인간 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 능력
- [0540] 인간 IL-11 매개성 신호 전달을 중화하는 능력을 조사하기 위해, 심장 심방 인간 섬유아세포를 24시간 동안 TGF β 1(5 ng/ml)의 존재하에서, 다양한 농도의 D11R1 또는 D11R2의 존재 또는 부재하에서, 96웰 플레이트의 웰에 배양하였다.

- [0541] TGFβ1은 IL-11의 발현을 촉진하고, 이는 결국 휴지기의 섬유아세포의 활성화된, αSMA-양성 섬유아세포로의 전이를 유도한다. 중화 IL-11이 활성화된 αSMA-양성 섬유아세포로의 TGFβ1 유도성 전이를 방지한다는 점은 이전에 밝혀진 바 있다.
- [0542] αSMA의 발현을 오페레타 고품량 영상화 시스템으로 자동화된 고속 처리 방식으로 분석하였다.
- [0543] D11R1 또는 D11R2를 TGFβ1으로 자극된 섬유아세포 배양물에 5 ng/ml, 50 ng/ml 및 500 ng/ml의 최종 농도로 첨가하고, 24시간의 배양 기간 종료 시, 배양물 중 αSMA-양성 섬유아세포의 백분율을 결정하였다.
- [0544] D11R1과 D11R2 둘 다 인간 IL-11에 의해 매개된 신호 전달을 용량 의존적인 방식으로 중화할 수 있음이 증명되었다.
- [0545] 실험 결과를 도 32a 및 도 32b에 나타내었다. D11R1과 D11R2 둘 다 인간 IL-11에 의해 매개된 신호 전달을 용량 의존적인 방식으로 중화할 수 있음이 증명되었다.
- [0546] D11R1 및 D11R2 분자에 대한 IC₅₀은 약 1 nM인 것으로 결정되었다.
- [0547] 16.2 마우스 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 능력
- [0548] 위의 섹션 16.1에 기술된 것과 동일한 절차를 따라, 그러나 인간 심방 섬유아세포 대신 마우스 피부 섬유아세포를 이용하여, 마우스 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 D11R1 및 D11R2의 능력을 조사하였다.
- [0549] 유인 IL-11 수용체의 부재하에서의 배양물과 비교하여 D11R1 또는 D11R2의 존재하에서 24시간 배양 기간의 종료 시 αSMA-양성 섬유아세포의 비율의 상대적인 감소의 관찰로 결정된 바와 같이, D11R1 및 D11R2는 마우스 피부 섬유아세포에서 IL-11/IL-11R 신호 전달을 중화할 수 있는 것으로 입증되었다.
- [0550] 16.3 IL-11에 대한 유인 IL-11 수용체 친화력의 분석
- [0551] D11R1 및 D11R2를 대상으로 ELISA 검정법에 의해 인간 IL-11에 대한 결합 친화력을 분석하였다.
- [0552] 제조합 인간 IL-11은 젠스크립트로부터 입수하였고, 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)가 접합된 항-FLAG 항체를 입수하였다. 코닝 96웰 ELISA 플레이트는 시그마로부터 입수하였다. 피어스 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) ELISA 매트릭스 키트는 라이프 테크놀로지스에서 입수하였다(0.4 g/mL TMB 용액, 시트르산 완충액 중 0.02 % 과산화수소). 소 혈청 알부민과 황산은 시그마에서 입수하였다. 세척 완충액은 인산 완충 식염수 중 0.05% 트윈(Tween)-20으로 구성하였다(PBS-T). 테칸 인피니트 200 프로 나노퀀트를 흡광도를 측정하는 데 사용하였다.
- [0553] 이전에 기술된 바와 같이(Unverdorben et al., (2016) MAbs 8, 120-128.), 간접적 ELISA를 수행하여 50%의 유효 농도(EC₅₀)에서 D11R1 및 D11R2의 결합 친화력을 평가하였다. ELISA 플레이트를 4℃에서 밤새 제조합 인간 IL-11 1 μg/mL로 코팅하고, 남아 있는 결합 자리를 PBS 중 2% BSA로 차단하였다. D11R1 및 D11R1을 PBS 중 1% BSA로 희석하고, 적정하여 800, 200, 50, 12.5, 3.125, 0.78, 0.195, 및 0.049 ng/mL의 작용 농도를 수득하였고, 실온에서 2시간 동안 2반복으로 배양하였다. HRP가 접합된 항-FLAG 항체로 항원-유인 IL-11 수용체 결합의 검출을 수행하였다. 검출 항체와의 2시간의 배양 후, 100 μl의 TMB 매트릭스를 15분 동안 첨가하고, 발색 반응을 2 M H₂SO₄ 100 μl로 정지시켰다. 흡광도 판독은 570 nm에서의 기준 파장 보정을 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 데이터를 유인 IL-11 수용체 농도를 로그 변환하여 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 적합화하고, 비대칭(5개 매개변수) 로지스틱 용량-반응 곡선으로 비 선형 회귀 분석을 수행하여 EC₅₀ 값을 결정하였다.
- [0554] 위에 기술된 것과 동일한 재료와 절차를 수행하여 젠스크립트에서 입수한 제조합 컷과 IL-11에 대한 결합 친화도를 결정하였다.
- [0555] 16.4 다양한 조직에서 인간 IL-11 매개성 신호 전달을 억제하는 능력
- [0556] 심장 심방 인간 섬유아세포 대신, 간, 폐, 신장, 눈, 피부, 췌장, 비장, 장, 뇌 및 골수로부터 유래된 인간 섬유아세포를 실험에 이용하였다는 점을 제외하고, 기본적으로 섹션 18.1에 기술된 바에 따라 여러 가지 상이한 조직으로부터 수득된 섬유아세포에서 IL-11 매개성 신호 전달을 중화하는 유인 IL-11 수용체 D11R1 및 D11R2의 능력을 조사하였다.
- [0557] 유인 IL-11 수용체 부재하에서의 배양과 비교하여 유인 IL-11 수용체의 존재하에서 24시간의 배양 기간의 종료 시 αSMA-양성 섬유아세포의 비율의 상대적인 감소를 관찰하여 결정한 바에 따르면, D11R1 및 D11R2는 여러 가지 상이한 조직으로부터 유래된 섬유아세포에서 신호 전달을 중화할 수 있는 것으로 입증되었다.

- [0558] **실시예 17: 유인 IL-11 수용체를 이용한 생체 내에서의 섬유증의 억제**
- [0559] 유인 IL-11 수용체의 치료적 유용성을 여러 가지 상이한 조직에 대한 섬유증의 생체 내 마우스 모델에서 증명하였다.
- [0560] **17.1 심장 섬유증**
- [0561] 펌프를 이식하고, 28일 동안 마우스에 AngII(2 mg/kg/일)를 처리하였다.
- [0562] 유인 IL-11 수용체 D11R1 또는 D11R2를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 실험 종료 시, 열량 측정식 하이드록시프롤린 기반 분석 키트를 이용하여 마우스의 심방에서 콜라겐 함량을 평가하고, 섬유증 마커인 Col1A2, α SMA(ACTA2) 및 피브로넥틴(Fn1)의 RNA 발현 수준을 qPCR로 분석하였다.
- [0563] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 유인 IL-11 수용체가 처리된 마우스는 미처리/비히클 처리 대조군과 비교하여 심장 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0564] **17.2 신장 섬유증**
- [0565] 신장 섬유증의 마우스 모델을 확립하였으며, 섬유증은 비히클(0.3 M NaHCO₃) 중 염산(180 mg/kg)의 복강 내 주사에 의해 유도하였다. 대조군 마우스는 비히클만을 투여하였다.
- [0566] 유인 IL-11 수용체 D11R1 또는 D11R2를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 28일에 신장을 제거하여 중량을 측정하고, 이를 메이슨 트릭롬 염색 및 시리우스 염색을 위해 10% 중성 완충 포르말린 중에 고정시키거나 콜라겐 분석, RNA 및 단백질 연구를 위해 급속 동결시켰다.
- [0567] 트리졸 시약(인비트로젠)과 퀴아젠 티슈라이저 방법에 이어, 알앤이지 컬럼(퀴아젠) 정제를 이용하여 급속 동결된 신장으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 아이스크립트(iScript™) cDNA 합성 키트를 이용하여 cDNA를 제조하였으며, 제조업체의 지시에 따라, 각각의 반응물은 총 RNA 1 μ g을 함유하였다. 40 사이클에 걸쳐 스텝원플러스(StepOnePlus™, 어플라이드 바이오시스템)를 이용하여 타크만(TaqMan, 어플라이드 바이오시스템) 또는 신속 SYBR 그린(퀴아젠) 기술로 샘플에 대해 삼반복으로 정량적 RT-PCR 유전자 발현 분석을 수행하였다. 발현 데이터를 GAPDH mRNA 발현 수준에 대해 정규화하고, 2- $\Delta\Delta$ Ct 방법을 이용하여 배수 변화를 계산하였다. 급속 동결된 신장을 50 mg/ml의 농도의 6M HCl 중에서 가열하여(95°C, 20시간) 산 가수분해시켰다. 제조업체의 지시에 따라 퀵자임 총 콜라겐 분석 키트(퀵자임 바이오사이언스)를 이용하여 하이드록시프롤린의 비색 검출을 기반으로 가수분해물 중 총 콜라겐의 양을 정량화하였다.
- [0568] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 유인 IL-11 수용체가 처리된 마우스는 미처리/비히클 처리 대조군과 비교하여 신장 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0569] **17.3 폐 섬유증**
- [0570] 0일째에 마우스에 블레오마이신을 기관 내 투여 처리하여 폐에서의 섬유증 반응(폐 섬유증)을 확립하였다.
- [0571] 유인 IL-11 수용체 D11R1 또는 D11R2를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 21일째에 마우스를 희생시켜, 섬유증 마커의 차이를 분석하였다.
- [0572] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 유인 IL-11 수용체가 처리된 마우스는 미처리/비히클 처리 대조군과 비교하여 폐 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0573] **17.4 피부 섬유증**
- [0574] 0일째에 마우스에 블레오마이신을 피하 투여 처리하여 피부에서의 섬유증 반응을 확립하였다.
- [0575] 유인 IL-11 수용체 D11R1 또는 D11R2를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하였다. 21일째에 마우스를 희생시켜, 섬유증 마커의 차이를 분석하였다.
- [0576] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 유인 IL-11 수용체가 처리된 마우스는 미처리/비히클 처리 대조군과 비교하여 피부 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.
- [0577] **17.5 눈 섬유증**
- [0578] 위의 실시예 7.6에 기술된 바와 같이, 마우스에 섬유주절제술을 시행하여 눈에서 상처 치유 반응을 일으켰다.
- [0579] 유인 IL-11 수용체 D11R1 또는 D11R2를 정맥 내 주사로 상이한 마우스 군에 투여하고, 눈 조직에서 섬유증을 관

찰하였다.

[0580] 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 유인 IL-11 수용체가 처리된 마우스는 미처리/비히클 처리 대조군과 비교하여 눈 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0581] 17.6 기타 조직

[0582] 섬유증에 미치는 유인 IL-11 수용체 D11R1 또는 D11R2 처리의 영향을 간, 신장, 장과 같은 다른 조직에 대한 섬유의 마우스 모델에서도 분석하고, 다기관(즉, 전신성) 섬유증과 관련된 모델에서도 분석하였다.

[0583] 섬유증 반응을 측정하고 유인 IL-11 수용체가 처리된 마우스와 미처리 마우스, 또는 비히클 처리 대조군 사이를 비교하였다. 섬유증 마커의 감소된 발현으로 증명되는 바와 같이, 유인 IL-11 수용체가 처리된 마우스는 미처리/비히클 처리 대조군과 비교하여 눈 조직에서 감소된 섬유증 반응을 나타내었다.

[0584] 실시예 18: IL-11 반응에 대한 유전자 바이오마커

[0585] 섬유증의 잠재적인 바이오마커로서 IL-11 단백질을 측정하는 것 이외에도, 본 발명자들은 인간에서 IL-11 분비 상태를 예측할 수 있는 검정법을 개발하였다. 이 검정법은 IL-11 관련 임상 시험에서 동반 진단법으로 이용될 수 있다.

[0586] 본 발명자들은 먼저 RNA-seq 데이터(도 16 오류! 참조 출처 찾을 수 없음)를 생성하고, 일루미나(Illumina)가 공급한 형광 프로브 혼성화를 기반으로 한 SNP 어레이(휴먼옵니익스프레스(HumanOmniExpress) 24)를 이용하여 코호트에서 69명의 인종 매치된(중국인) 개체의 유전자형을 결정하였다.

[0587] 그런 다음, 우리는 전장 유전체 연관 eQTL 분석을 수행하여, 자극되지 않은 섬유아세포에서, TGFβ1 자극된(5 ng/ml, 24시간) 섬유아세포에서, 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)이 IL-11 또는 IL-11RA의 RNA 전사체 수준에 영향을 미치는지를 평가하였다. 또한, 본 발명자들은 TGFβ1 자극 시 IL-11의 증가(=반응)가 유전자형에 의존하는지를 시험하였다.

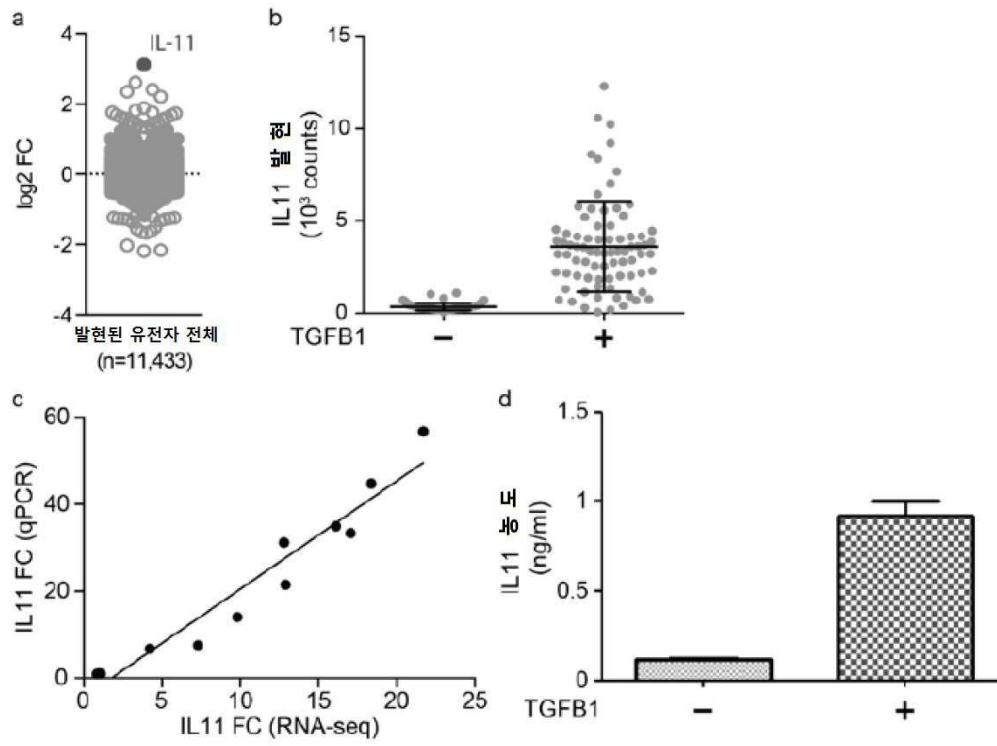
[0588] 처음에 모든 개체에서 IL-11과 IL-11RA 둘 다에 대한 리드 카운트(read count)를 정량화하고, DESeq2 방법(Love et al., Genome Biology 2014 15:550)의 분산 안정화(VST) 접근법을 이용하여 이들 카운트를 변환하였다. 그런 다음, 자극하지 않은 세포(VST_{unstim})와 자극한 세포(VST_{stim})에서 IL-11 및 IL-11RA 발현을 고려하였다. IL-11의 증가를 평가하기 위해, 발현의 델타를 또한 VST_{stim} - VST_{unstim}으로 계산하였다. 본 발명자들은 분석 전에 RNA 시퀀싱 라이브러리 배치, RNA RIN 품질 점수, 라이브러리 농도, 라이브러리 단편 크기, 연령, 성별과 같은 공변량을 사용하여 발현 값을 보정하였다. SNP 및 전사체 발현, 또는 델타 발현, 쌍은 매트릭스 eQTL 접근법(Andrey A. Shabalin., Bioinformatics 2012 May 15; 28(10): 1353-1358)을 이용하여 분석하였다.

[0589] 본 발명자들은 자극하지 않은 세포에서 IL-11 발현에 유의미하게 영향을 미치는 시스 또는 트랜스에서의 변이를 관찰하지 않았다. 그러나, 본 발명자들은 자극된 = 섬유증 섬유아세포에서 발현을 조절하는 원거리 SNP를 검출하였다. 이들 변이는 낮은 수준의 IL-11을 발현하는 개체들과 섬유증에서 많은 양의 IL-11을 발현하는 개체들 사이의 집단을 계층화한다. 본 발명자들은 또한 TGFβ1에 반응하여 IL-11 발현의 증가를 예측하는 로컬 및 원거리 변이를 검출하였다. 이들 변이는 개체를 섬유증에서 높은 반응자와 낮은 반응자로 계층화하는 데 이용될 수 있다.

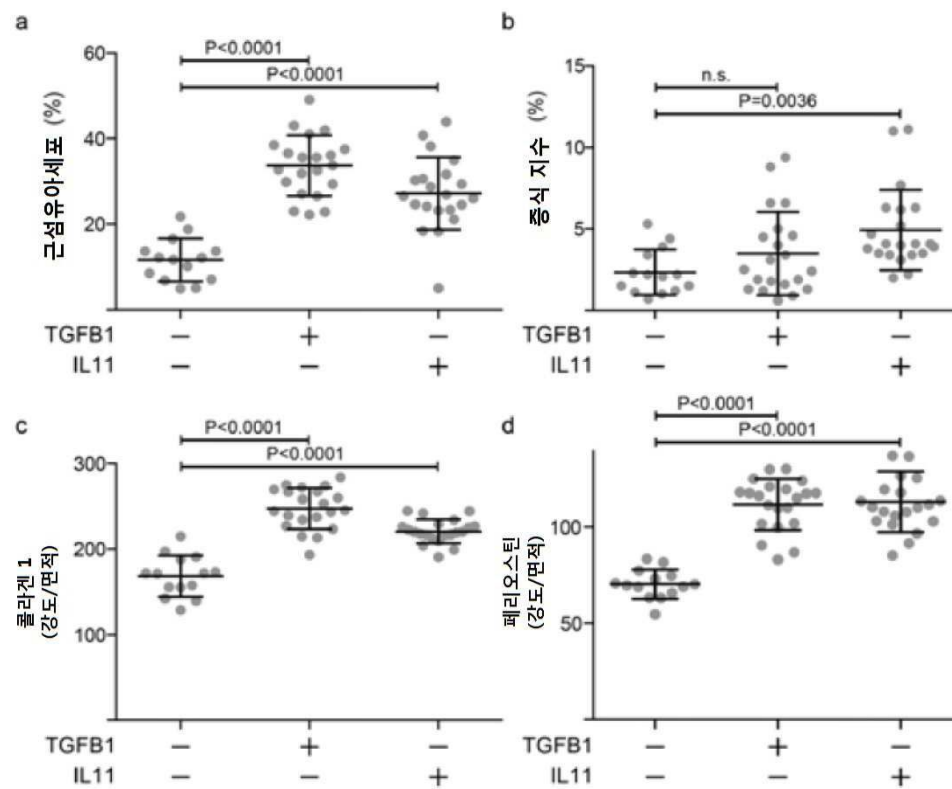
[0590] 확인된 SNP를 도 33 내지 도 35에 나타내었으며, 수반되는 데이터는 도 36 및 도 37에 나타내었다.

도면

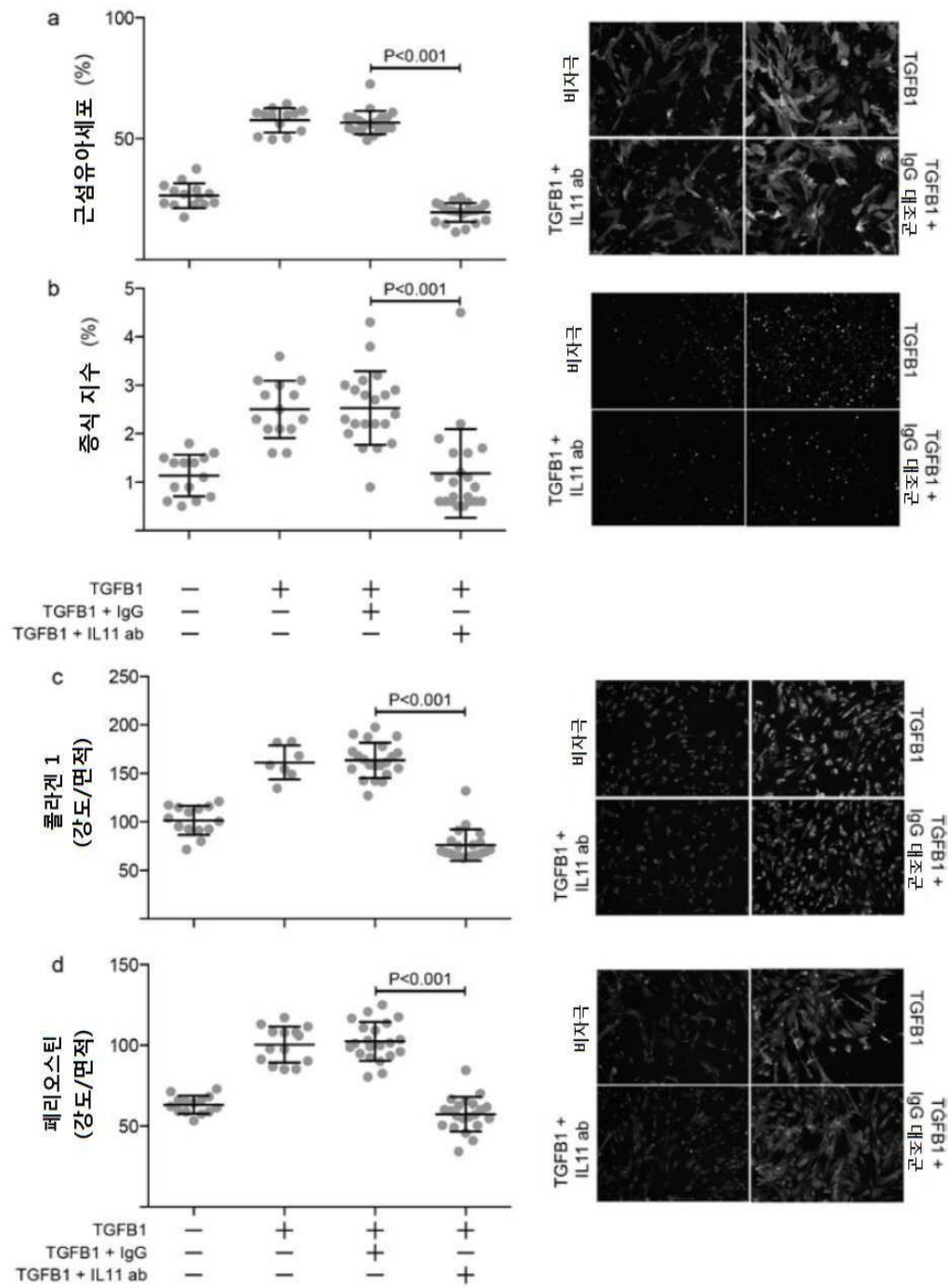
도면1



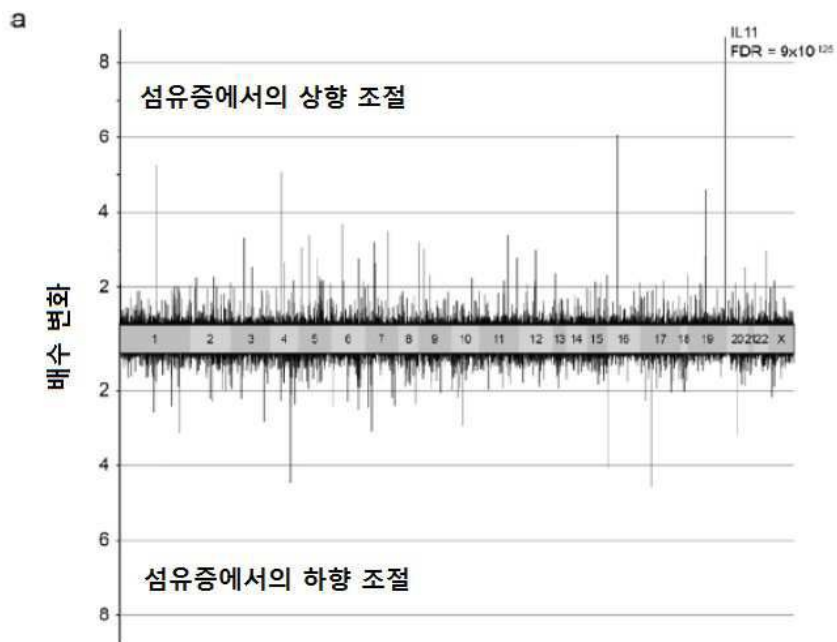
도면2



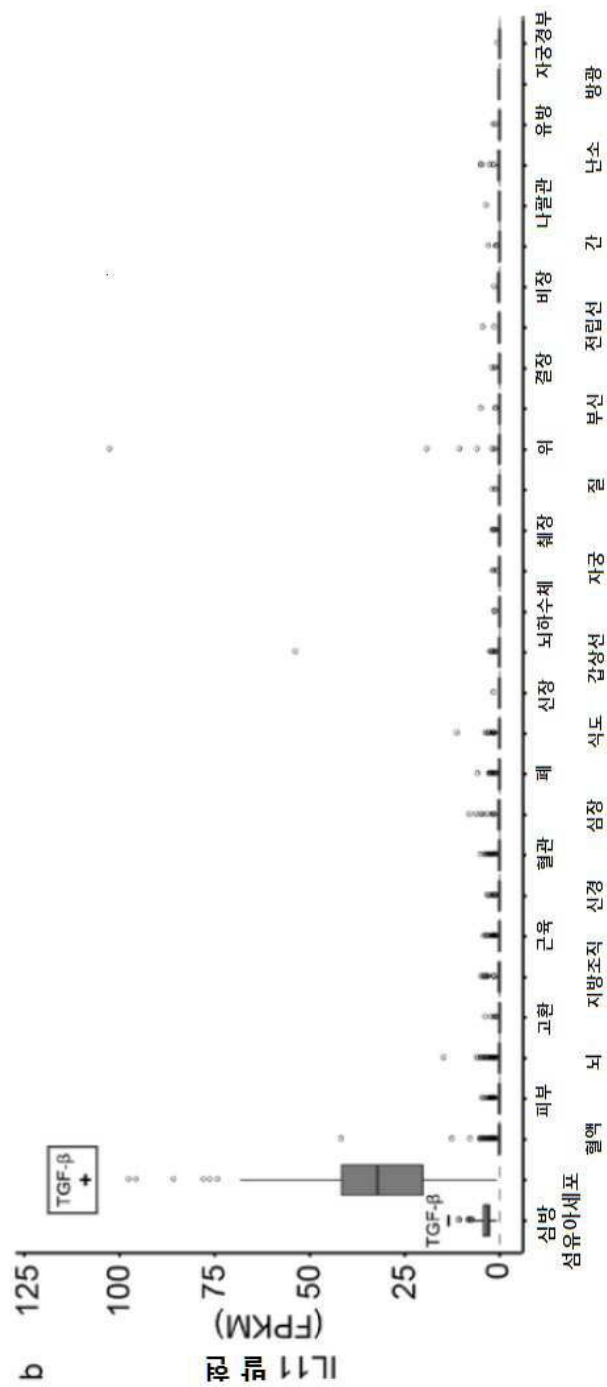
도면3



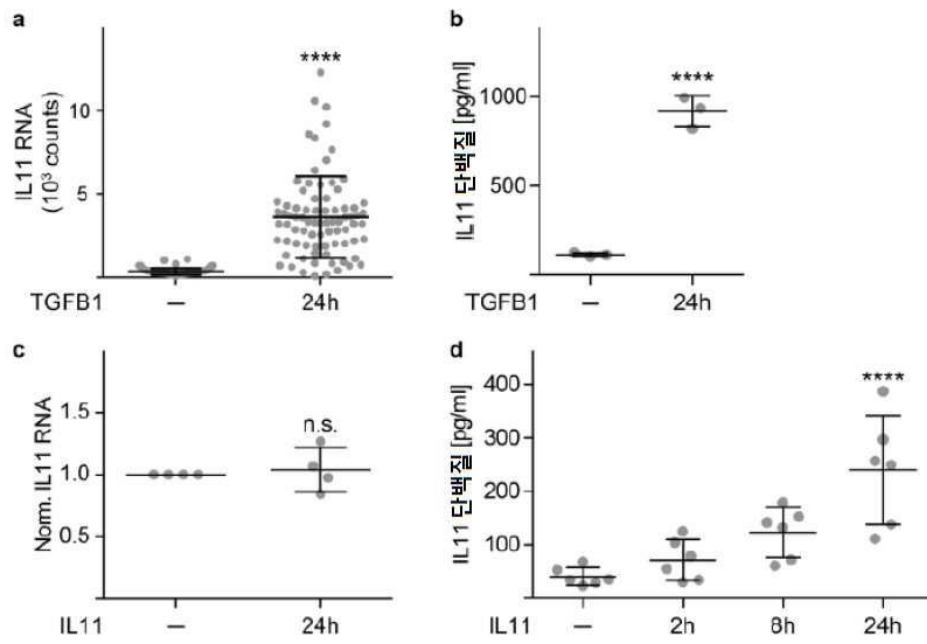
도면4a



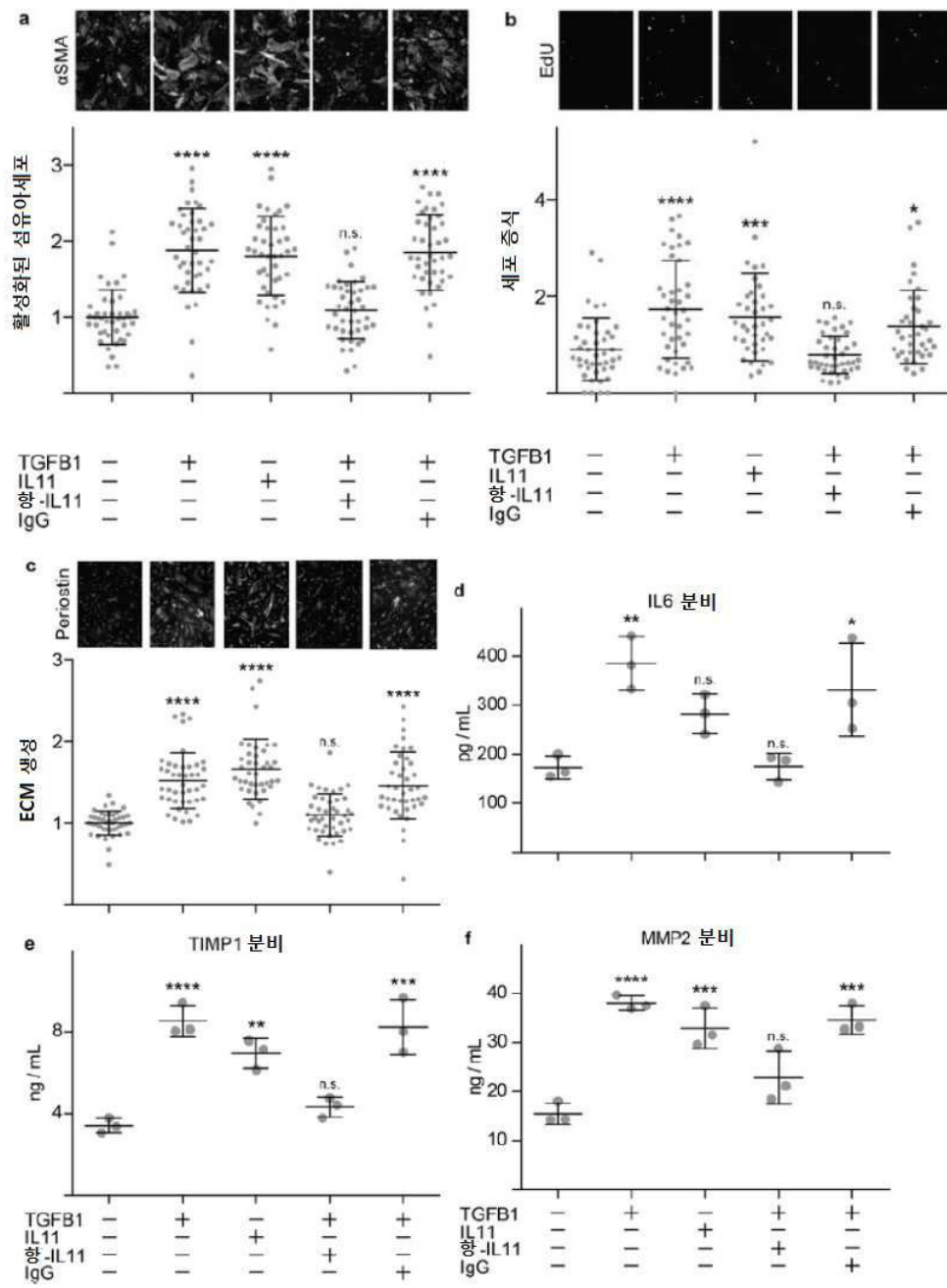
도면4b



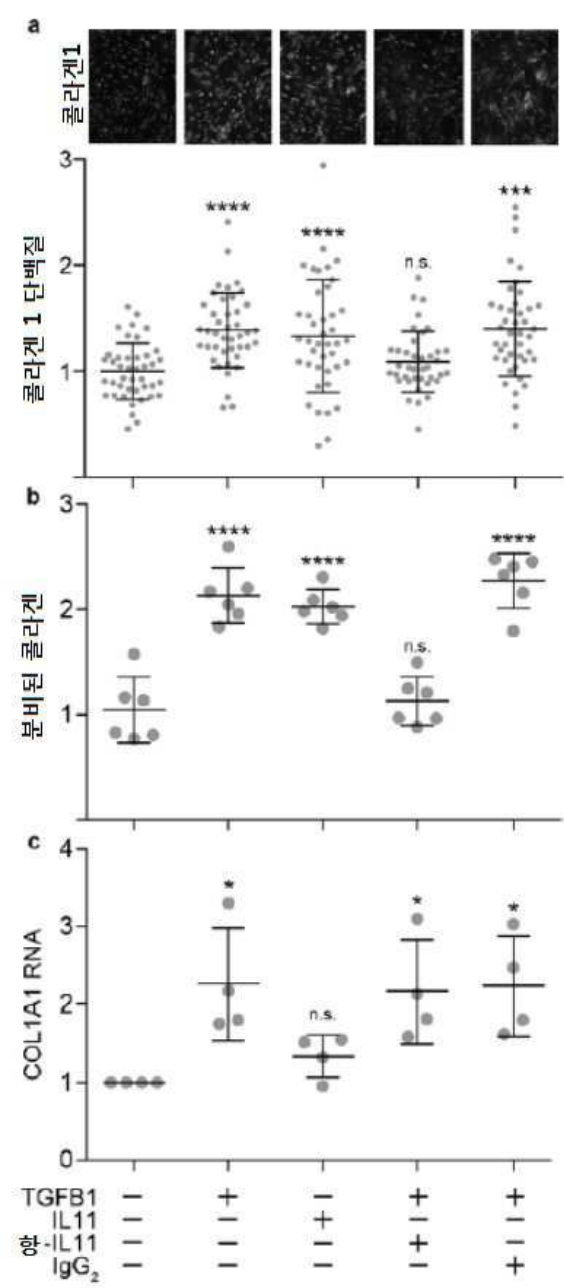
도면5



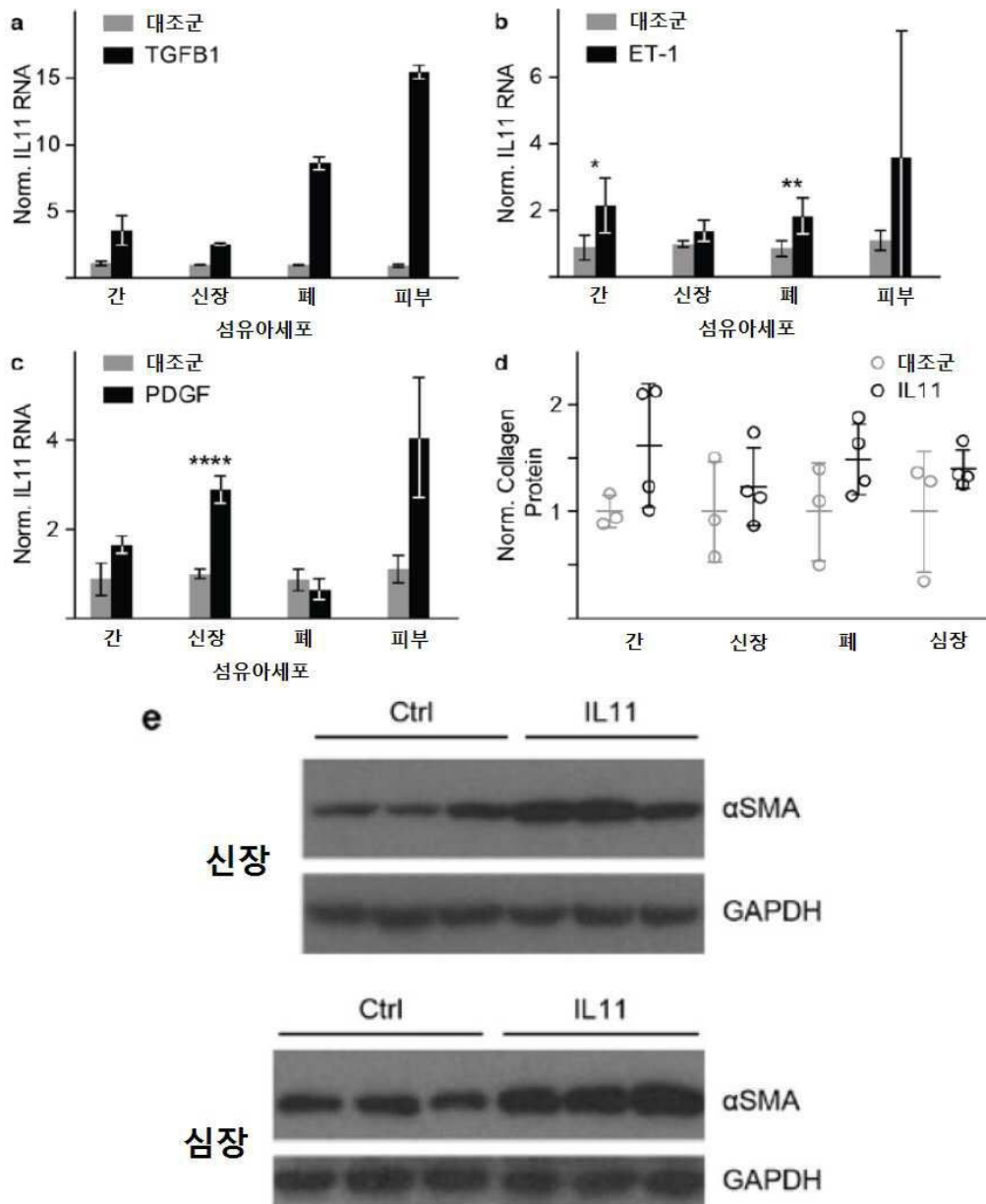
도면6



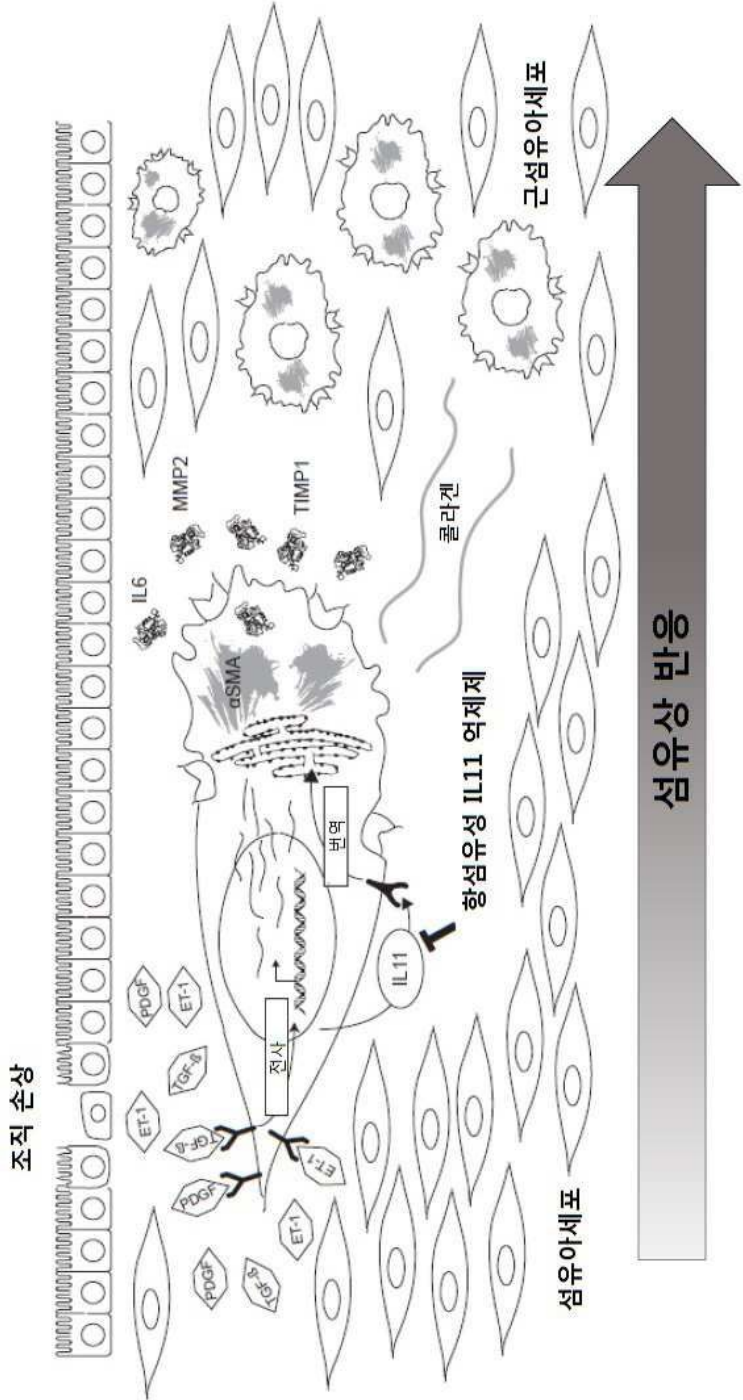
도면7



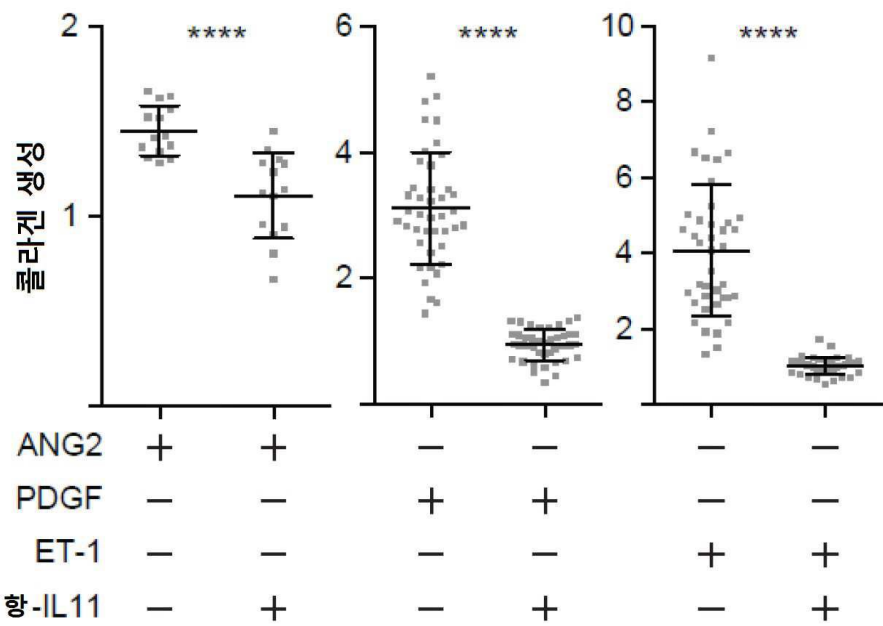
도면8



도면9



도면10



도면11

ACTGCGCGGCGCCCTGCTGCTCAGGGCACATGCCTCCCTCCCCAGGCCGCGGCCAGCTGACCCCTGGG
 CTCCCCCGGCAGCGGACAGGGAAGGGTTAAAGGCCCCCGGCTCCCTGCCCCCTGCCCTGGGGAAACCCCTG
 GCCCTGTGGGGACATGAACCTGTGTTTGCCGCCTGGTCTCTGGTCTGAGCCTGTGGCCAGATACAGCT
 TGTGCCCCCTGGGCGACACCTTGGCCCCCTCGAGTTTCCCCAGACCCTCGGGCCGAGCTGGACGACACCG
 TGCTCCTGACCCGCTCTCTCTGGCGGACACGCGGCGAGCTGGCTGCACAGCTGAGGAGCAAAATTCACAGC
 TGACGGGGACCACAACCTGGATTCCCTGCCACCCTGGCCATGAGTGCGGGGGCACTGGGAGCTCTACAG
 CTCCCAGGTGTGCTGACAAGGCTGCGAGCGGACCTACTGTCTACCTGCGGCACGTGCAGTGGCTGCGC
 GGGCAGGTGCTCTTCCCTGAAGACCCTGGAGCCCGAGCTGGGCACCCTGCAGGCCCGACTGGACCGGCT
 GCTGCGCCCGGCTGCAGCTCCTGATGTCGCCCGCTGGCCCTGCCCCAGCCACCCCGGACCCCGCGCGGCC
 CGCTGAGCGCCCCCTCTCAGCCTTGGGGGGCATCAGGGCCGCCACGCCATCTTGGGGGGGCTGCACC
 TGACTGCTTACTGGGCGGTGAGGGGACTGCTGCTGCTGAAGACTCGGCTGTGACCCGGGGCCAAAGCCA
 CCACCGTCTTCCAAAGCCAGATCTTTATTTATTTATTTATTTTTCAGTACTGGGGGCGAAACAGCCAGGTGA
 TCCCCCGCCATTATCTCCCCCTAGTTAGAGACAGTCTTCCGTGAGGCCCTGGGGGGCATCTGTGCCTTA
 TTTATACTTTATTTATTTTTCAGGAGCAGGGGTGGGAGGCAGGTGGACTCTTGGTCCCCGAGGAGGAGGGGA
 CTGGGGTCCCGGATTTCTTGGGTCTCCAAGAAGTCTGTCCACAGACTTCTGCCCTGGCTCTTCCCCATCA
 TGCTTGGGCGAGGAACATATATATTTATTTATTTAAGCAATTTACTTTTCATGTTGGGTGGGACGGAGGGGA
 AGGGAAGCTCTGGGTTTTTGTACAAAATTTGAGAAACCTTTGTGAGACAGAGAACAGGGAATTAATATGTG
 TCATACATATCCACTTGAGGGCGATTTGTCTGAGAGCTGGGGCTGGATGCTTGGGTAACCTGGGGCAGGGC
 AGGTGGAGGGGAGACCTCCATTTCAGGTGGAGGTCCCAGTGGGCGGGGACGCACTGGGAGATGGTTCGG
 TCACCCAGACAGCTCTGTGGAGGCAGGGTCTGAGCCTTGCTTGGGGCCCCGCACTGCATAGGGCCTTTTG
 TTTGTTTTTTGAGATGGAGTCTCGCTCTGTTGCTCAGGCTGGAGTGCAGTGAGGCAATCTGAGGTCACTG
 CAACCTCCACTCCCGGTTCAAGCAATTTCTCTGCCTCAGCCTCCCGATAGCTGGGATCAGAGTGTG
 CACCACCATGCCCAGCTAATTTATTTATTTCTTTTGTATTTTGTAGAGACAGGGTTTACCATTGTGGC
 CAGGCTGGTTTTGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCTCCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG
 GTGTGAGCCACCACACCTGACCCATAGGTCTTCAATAAATATTTAATGGAAGGTTCCACAAGTACCCTG
 TGATCAACAGTACCCGTATGGGACAAAGCTGCAGGTCAAGATGGTTCAATTATGGCTGTGTTTACCATAG
 CAAACTGGAAACAATCTAGATATCCAACAGTGGAGGGTTAAGCAACATGGTGCACTCTGGGATAGAACGCC
 ACCAGCGCGCCGGAGCAGGAGCTGATTTACGGGAGGCTAAGGAGAGAGGCTTGCTTGGGATATAGAAA
 GATATCCTGACATTGGCCAGGCATGGTGCTCACGCCTGTAATCTGGCACTTTGGGAGGACGAAAGCGAG
 TGGATCACTGAAGTCCAAGAGTTCGAGACCGGCTGCGAGACATGGCAAAACCCTGTCTCAAAAAGAAA
 GAATGATGTCTGACATGAAACAGCAGGCTACAAAACCACTGCATGCTGTGATCCCAATTTTGTGTTTT
 CTTTCTATATATGATTAAAAACAAAATCCTAAAGGGAAATACGCCAAAATGTTGACAATGACTGTCTCC
 AGGTCAAAGGAGAGAGGTGGGATTGTGGGTGACTTTTAAATGTGTATGATTGTCTGTATTTTACAGAATTT
 CTGCCATGACTGTGATTTTTCATGACACATTTTAAAAATAAACACTATTTTGTAGAATAACAGAAAAA
 A

[서열번호: 1]

CCTTCCAAAGCCAGATCTT [서열번호: 2]

GCCTGGGCAGGAACATATA [서열번호: 3]

CCTGGGCAGGAACATATAT [서열번호: 4]

GGTTCATTATGGCTGTGTT [서열번호: 5]

도면12

GCTGTAGCTGGTGAGAGGAAGTCCTAGAGGCTATGGACACTCTGCTGCTGGGATCACCGAGATGAGCAGC
 AGCTGCTCAGGGCTGAGCAGGGTCTGGTGGCCGTGGCTACAGCCCTGGTGTCTGCCTCCTCCCCCTGCC
 CCCAGGCCTGGGGCCCCCAGGGGTCCAGTATGGGCAGCCAGGGAGGTCCGTGAAGCTGTGTTGCTCCTGG
 AGTGACTGCCGGGGACCCAGTGTCTGGTTTCGGGATGGGGAGCCAAAGCTGTCCAGGGACCTGACTCT
 GGGCTAGGGCATGAAGTGGTCTGGCCAGGCAGACAGCACTGATGAGGGCACCTACATCTGCCAGACCC
 TGGATGGTGCACTTGGGGGACAGTGACCTGTCAGCTGGGCTACCTCCAGCCCCGCCCTGTTGTCTCCTG
 CCAAGCAGCCGACTATGAGAACTTCTCTTGCACTTGGAGTCCCAGCCAGATCAGCGGTTTACCCACCCGC
 TACCTCACCTCTACAGGAAGAAGACAGTCTAGGAGCTGATAGCCAGAGGAGGAGTCCATCCACAGGGC
 CCTGGCCATGCCACAGGATCCCCTAGGGGCTGCCCCGTGTGTTGTCCACGGGGCTGAGTTCTGGAGCCA
 GTACCGGATTAATGTGACTGAGGTGAACCCACTGGGTGCCAGCACACGCCTGCTGGATGTGAGCTTGCAG
 AGCATCTTGGCCCTGACCCACCCAGGGCTGCGGGTAGAGTCAGTACCAGGTTACCCCCGACGCCTGC
 GAGCCAGCTGGACATAACCTGCCTCCTGGCCGTGCCAGCCCCACTTCCTGCTCAAGTTCCGTTTGAGTA
 CCGTCCGGCGCAGCATCCAGCCTGGTCCACGGTGGAGCCAGCTGGACTGGAGGAGGTGATCACAGATGCT
 GTGGCTGGGCTGCCCCATGCTGTACGAGTCAGTGCCCGGGACTTTCTAGATGCTGGCACCTGGAGCACCT
 GGAGCCCGGAGGCCTGGGGAATCCGAGCACTGGGACCATACCAAAGGAGATACCAGCATGGGGCCAGCT
 ACACACGCAGCCAGAGGTGGAGCCTCAGGTGGACAGCCCTGCTCCTCAAGGCCCTCCCTCCAACCACAC
 CCTCGGCTACTTGATCACAGGGACTCTGTGGAGCAGGTAGCTGTGCTGGCGTCTTTGGGAATCCTTTCTT
 TCCTGGGACTGGTGGCTGGGGCCCTGGCACTGGGGCTCTGGCTGAGGCTGAGACGGGGTGGGAAGGATGG
 ATCCCCAAAGCCTGGGTTCTTGGCCTCAGTGATTCCAGTGGACAGGCGTCCAGGAGCTCCAAACCTGTAG
 AGGACCCAGGAGGGCTTCGGCAGATTCCACCTATAATTCTGTCTTGTGCTGGTGTGGATAGAAACCAGGCAG
 GACAGTAGATCCCTATGGTTGGATCTCAGCTGGAAGTTCTGTTTGGAGCCATTTCTGTGAGACCTGTGA
 TTTCAAATTTGCAGCTGAAAGGTGCTTGTACCTCTGATTTACCCAGAGTTGGAGTTCTGCTCAAGGAA
 CGTGTGTAATGTGTACATCTGTGTCCATGTGTGACCATGTGTCTGTGAAGGCCAGGGAACATGTATTCTT
 CTGCATGCATGTATGTAGGTGCCTGGGAGTGTGTGTGGTCTTGTCTGGCCCTTTCCCTTGCAGGGTTG
 TGCAGGTGTGAATAAA [서열번호: 6]

GGACCATACCAAAGGAGAT [서열번호: 7]

GCGTCTTTGGGAATCCTTT [서열번호: 8]

GCAGGACAGTAGATCCCT [서열번호: 9]

GCTCAAGGAACGTGTGTAA [서열번호: 10]

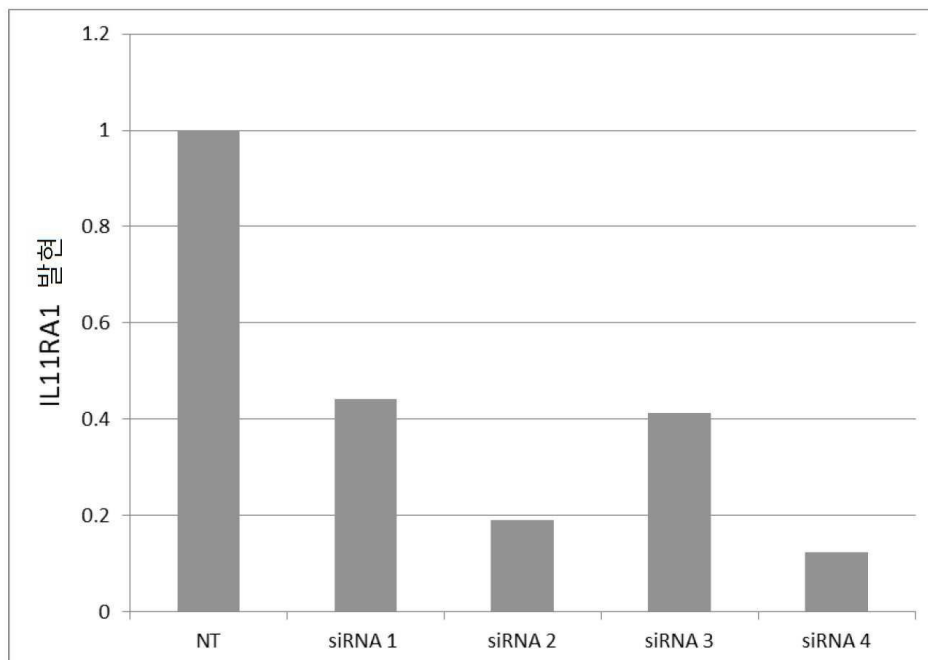
도면13

유전자명	유전자 ID/ 등록 번호	siRNA 명칭	siRNA 서열 (5'-3')	서열번호
IL-11	NM_000641.3	siRNA 1	CCUUCCAAAGCCAGAUCUdTdT AAGAUCUGGCUUUGGAAGGdTdT	11
IL-11	NM_000641.3	siRNA 2	GCCUGGGCAGGAACAUAUdTdT UAUAUGUUCUGCCCAGGCdTdT	12
IL-11	NM_000641.3	siRNA 3	CCUGGGCAGGAACAUAUdTdT AUAUAUGUUCUGCCCAGGdTdT	13
IL-11	NM_000641.3	siRNA 4	GGUUCAUUAUGGCUGUGUdTdT AACACAGCCAUAAUGAACCdTdT	14

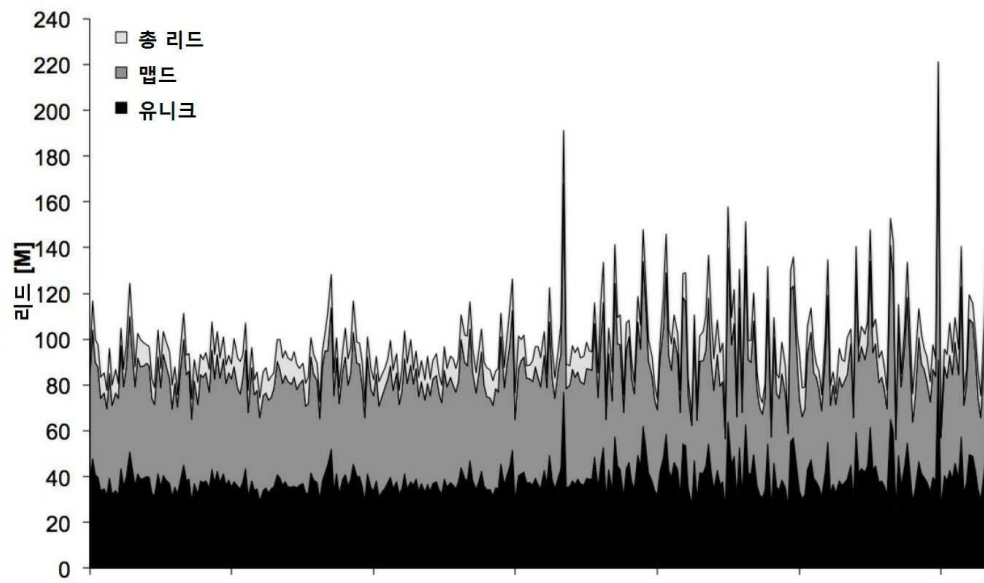
도면14

유전자명	유전자 ID/ 등록 번호	siRNA 명칭	siRNA 서열 (5'-3')	서열번호
IL-11R	U32324.1	siRNA 5	GGACCAUACCAAAGGAGAUdTdT AUCUCCUUUGGUAUGGUCCdTdT	15
IL-11R	U32324.1	siRNA 6	GCGUCUUUGGAAUCCUUdTdT AAAGGAUCCCAAAGACGCdTdT	16
IL-11R	U32324.1	siRNA 7	GCAGGACAGUAGAUGCCUAdTdT UAGGGAUCUACUGUCCUGCdTdT	17
IL-11R	U32324.1	siRNA 8	GCUCAAGGAACGUGUGUAdTdT UUACACACGUUCCUUGAGCdTdT	18

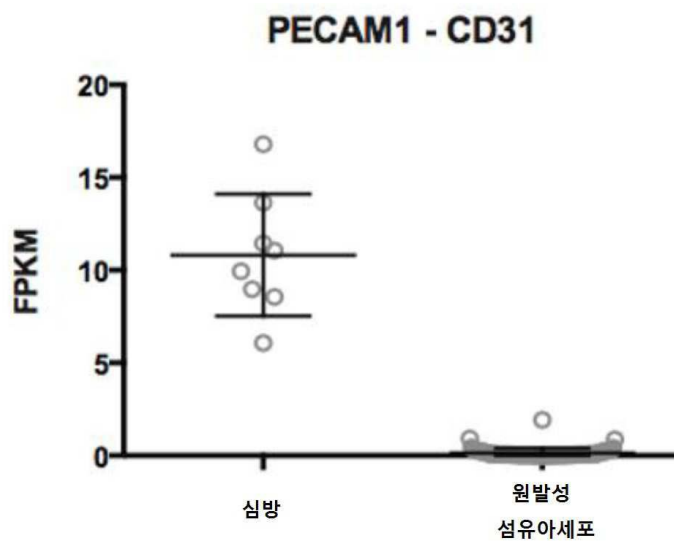
도면15



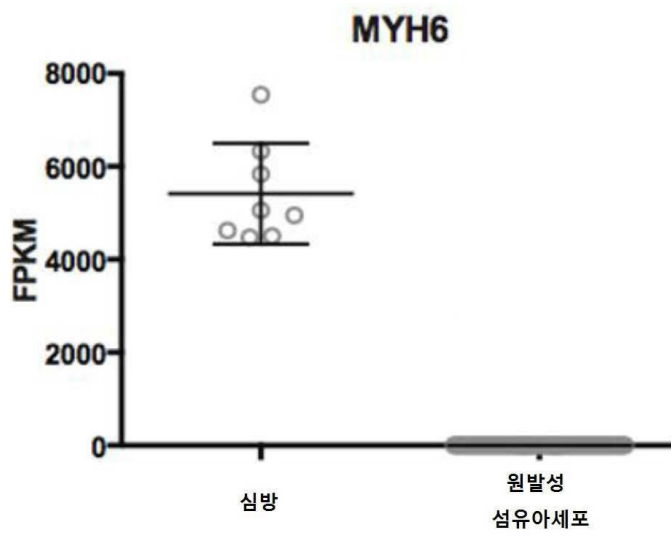
도면16



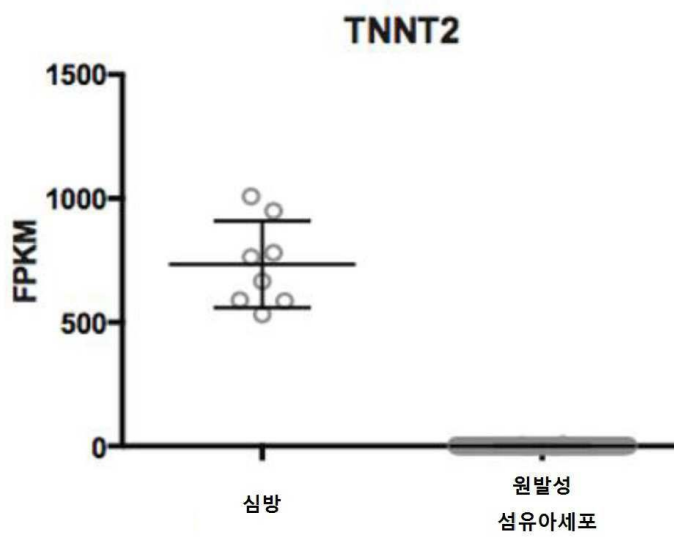
도면17a



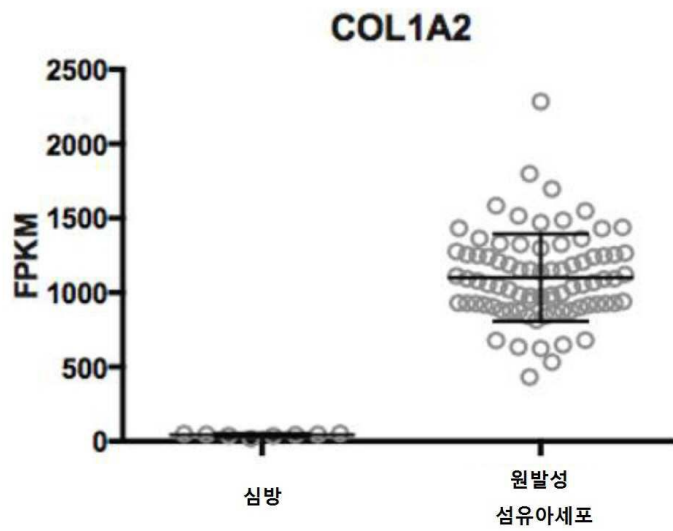
도면17b



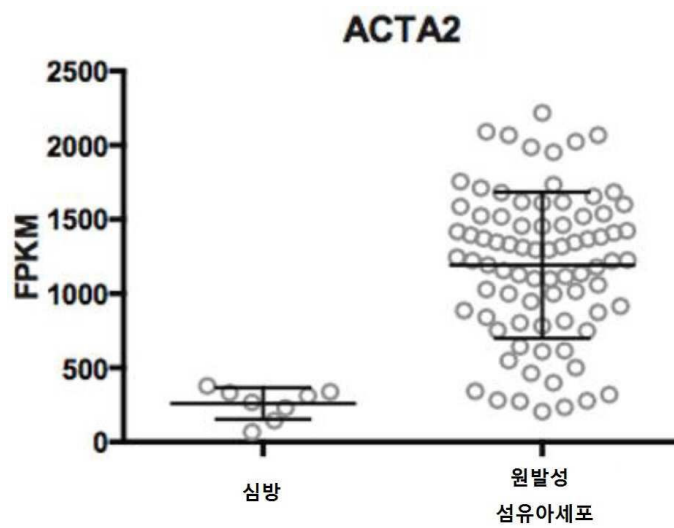
도면17c



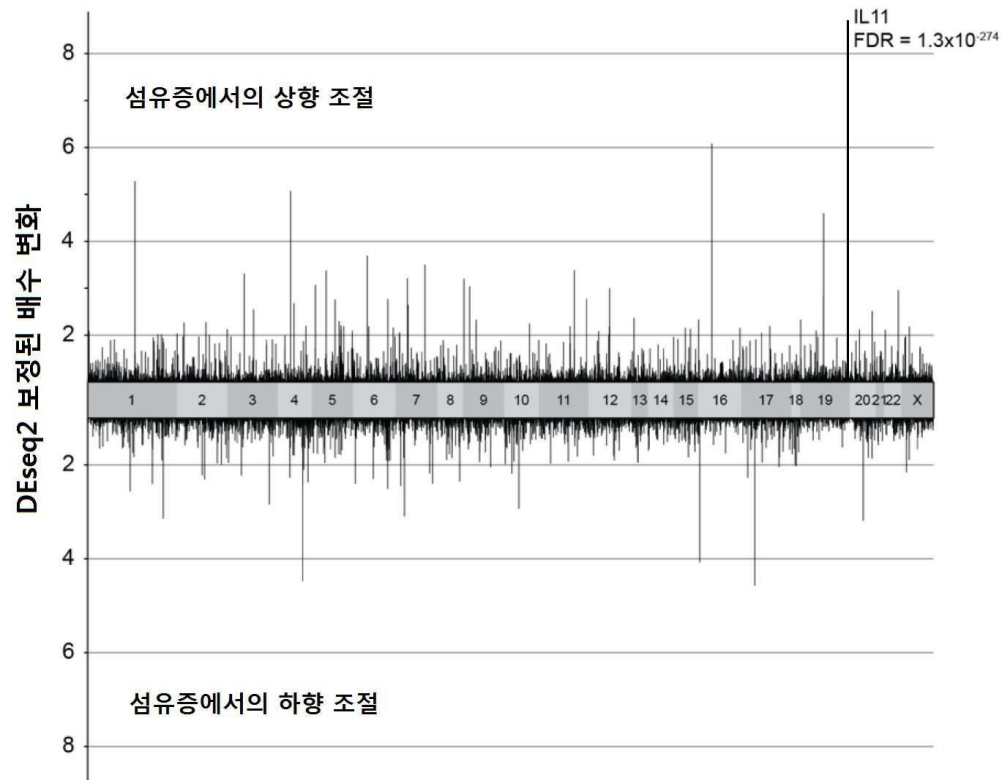
도면17d



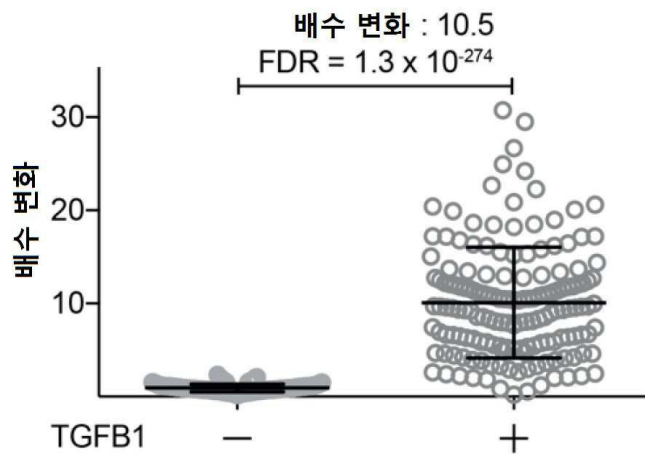
도면17e



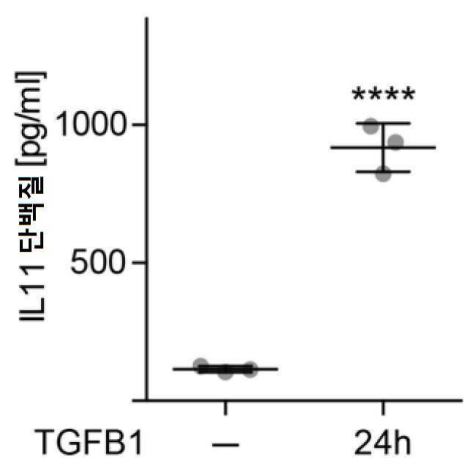
도면18a



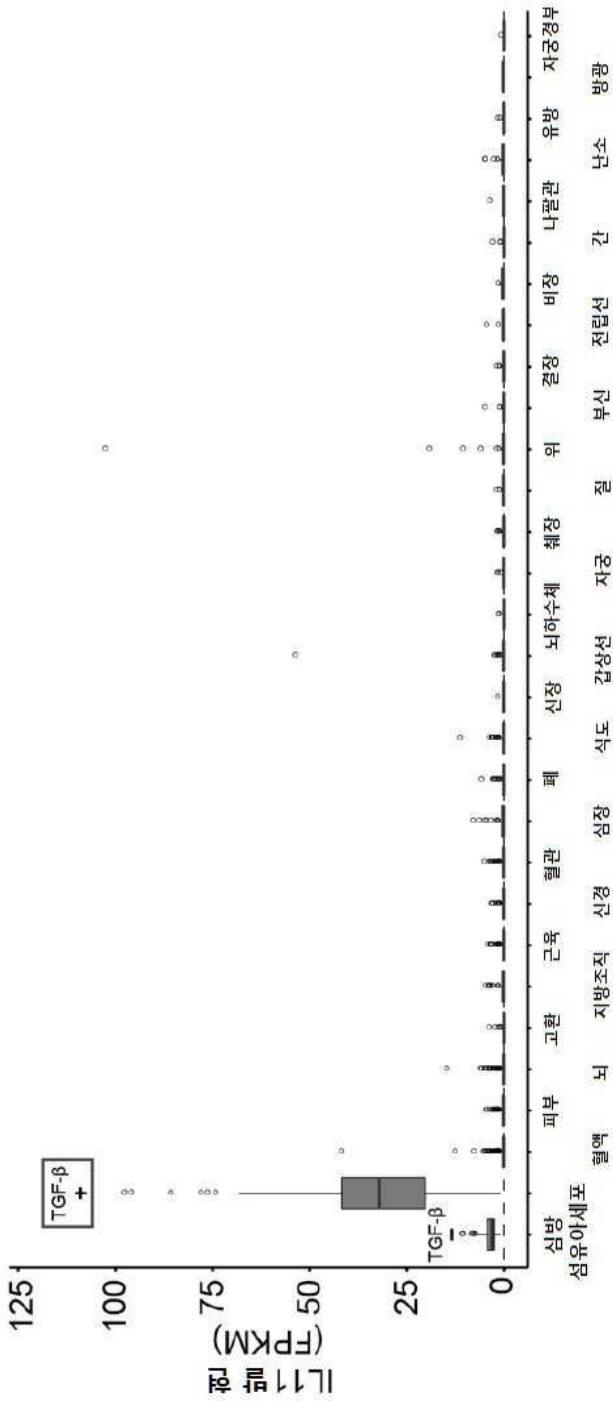
도면18b



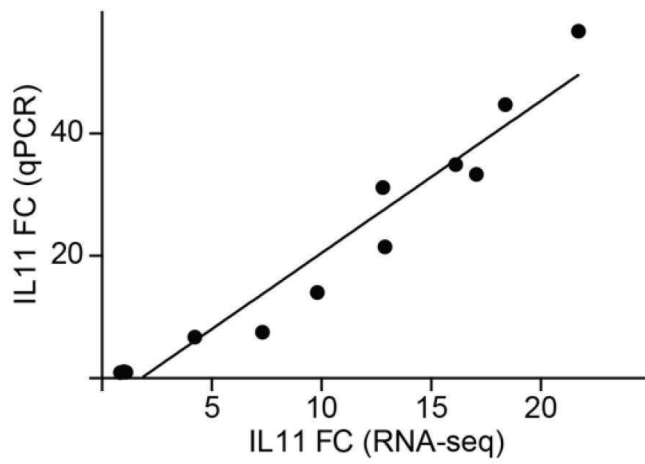
도면18c



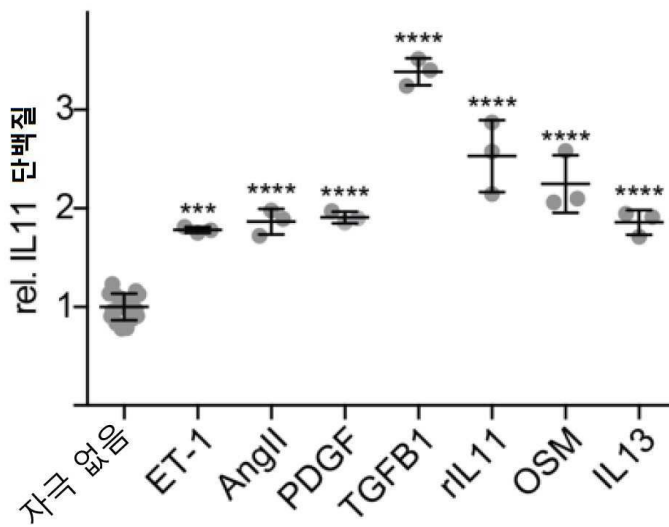
도면18d



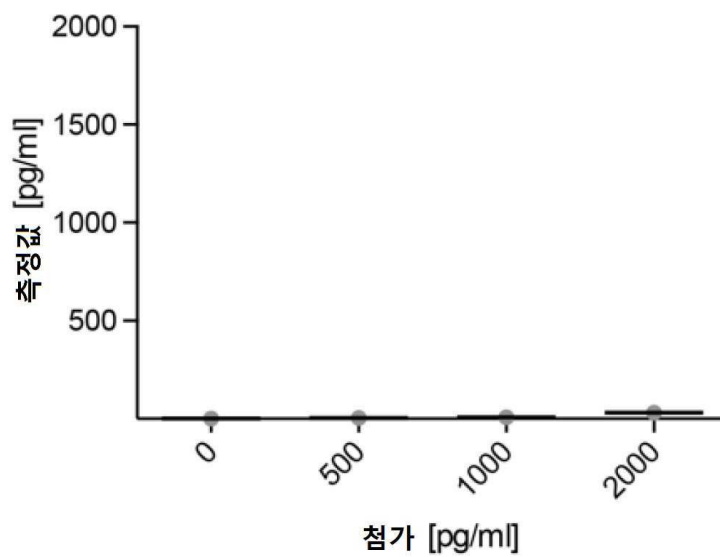
도면18e



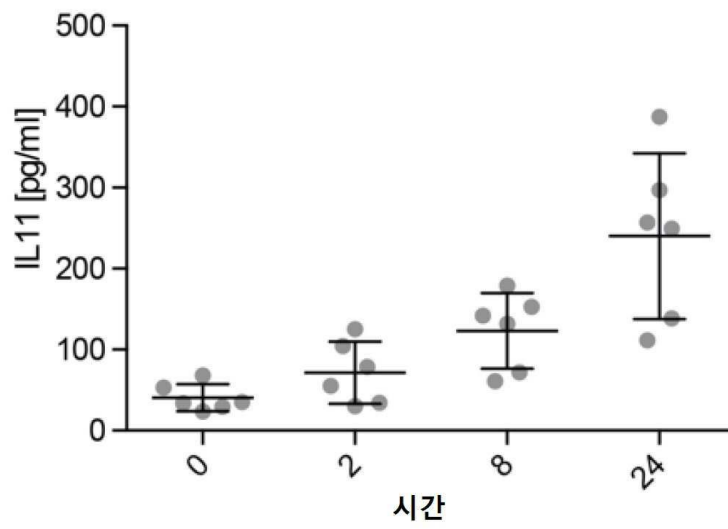
도면19a



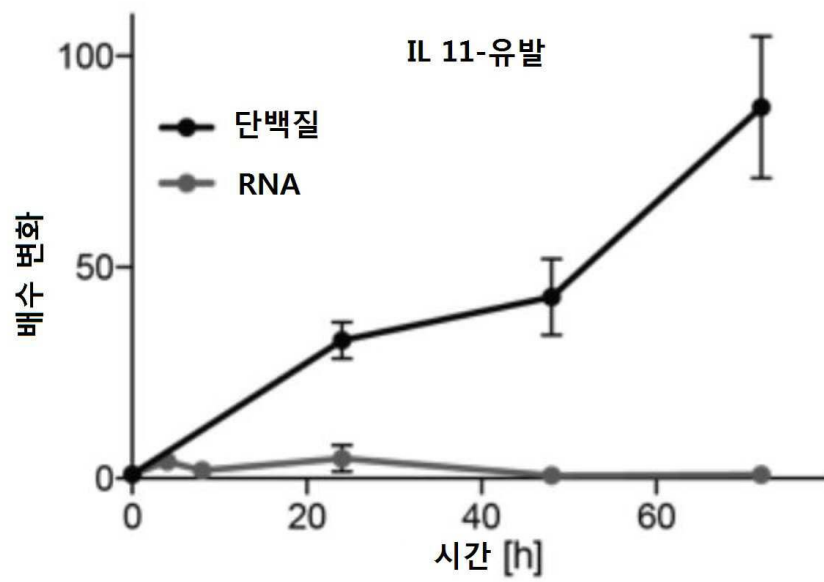
도면19b



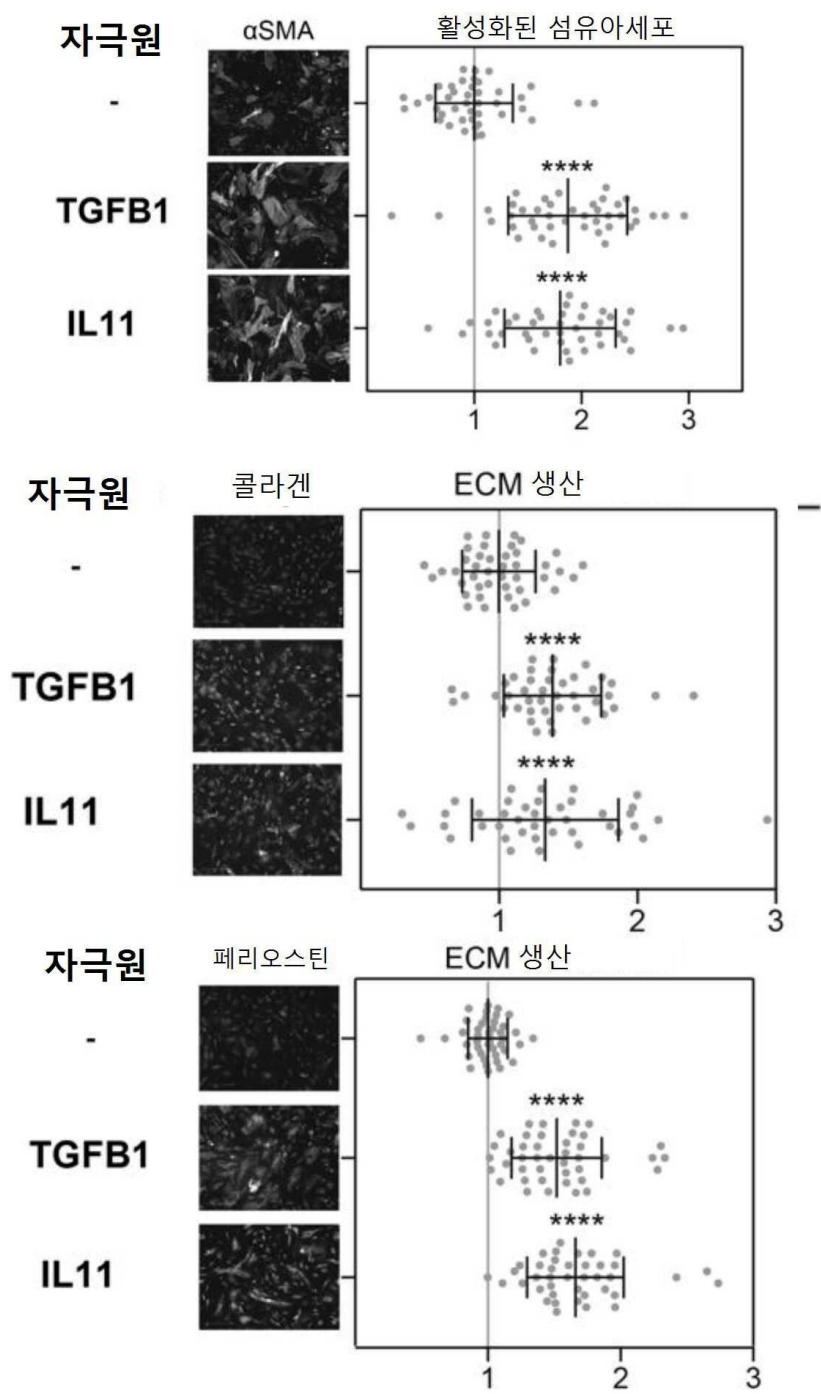
도면19c



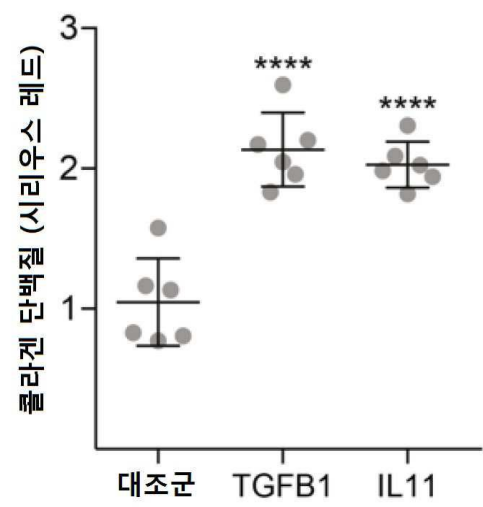
도면19d



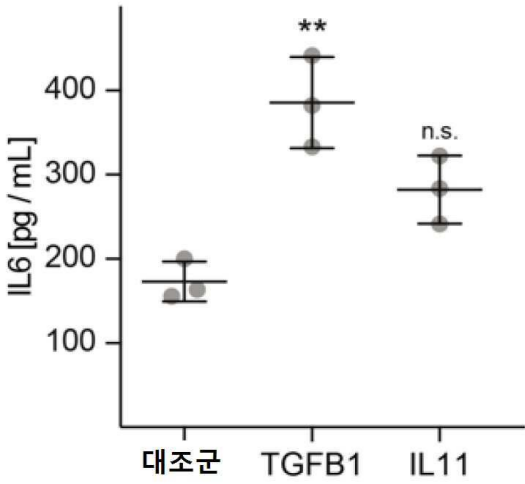
도면20a



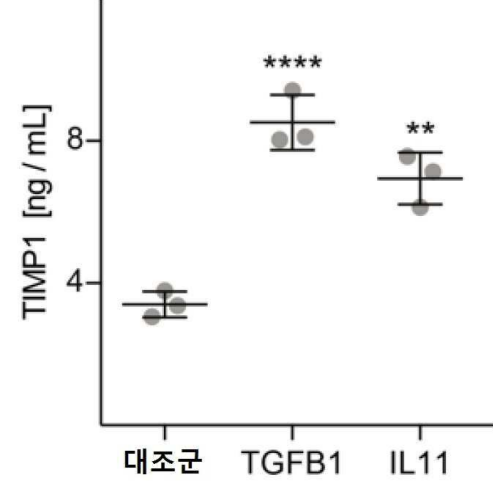
도면20b



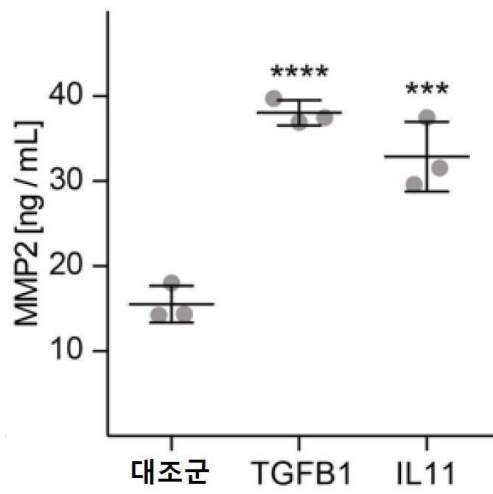
도면20c



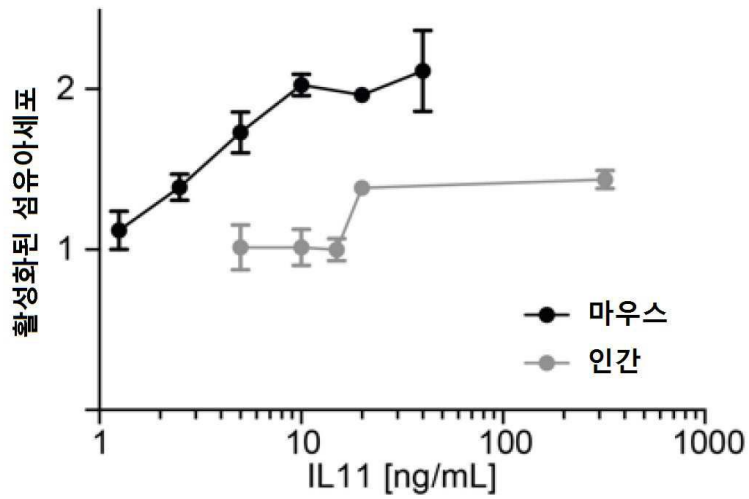
도면20d



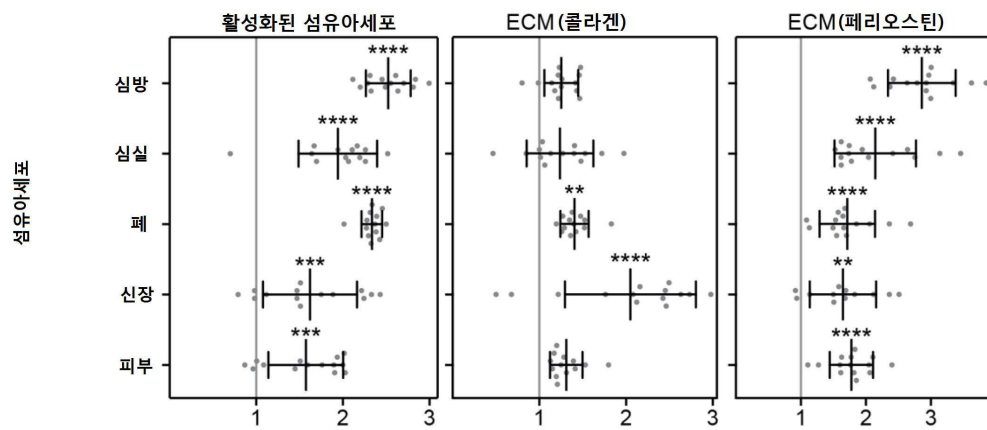
도면20e



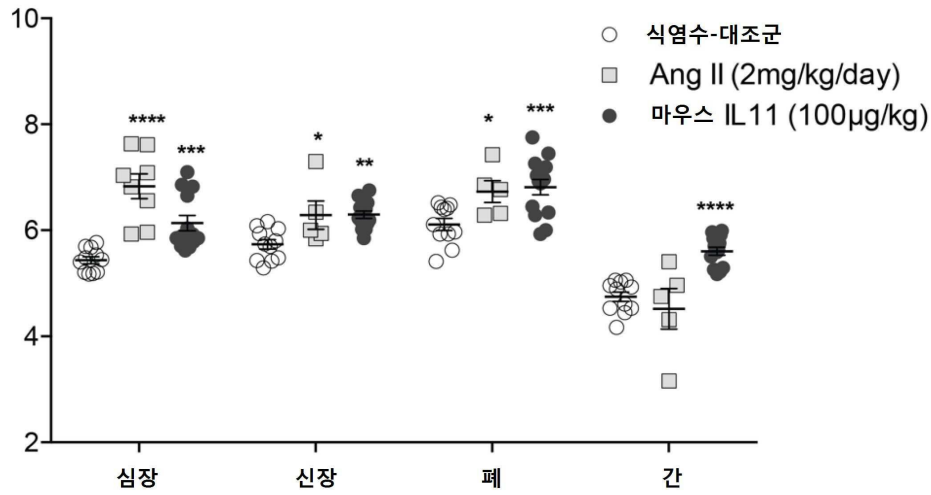
도면20f



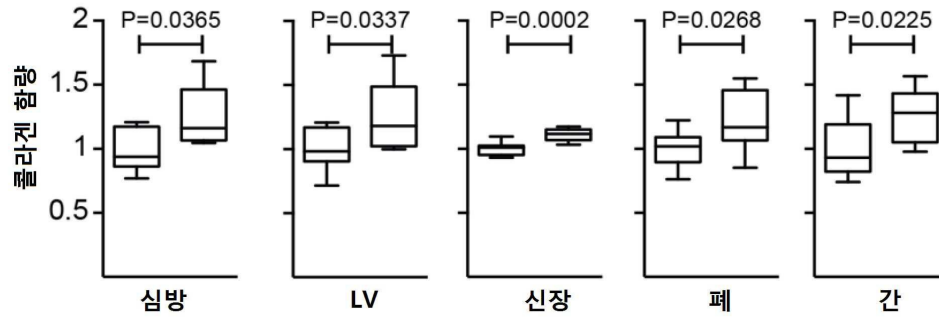
도면21a



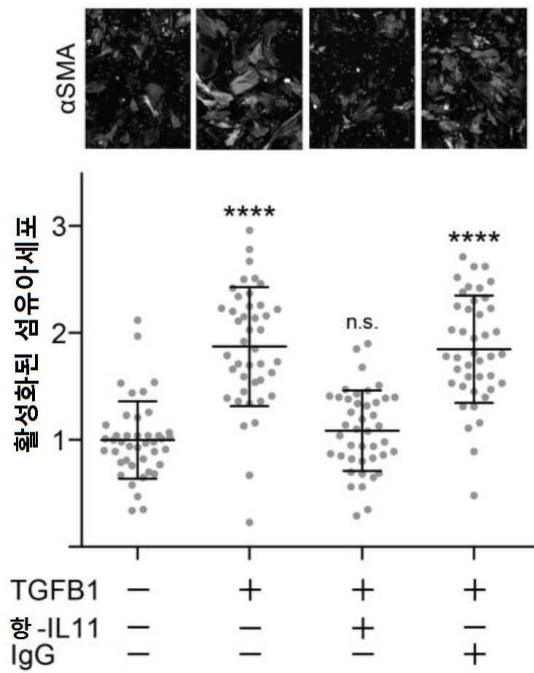
도면21b



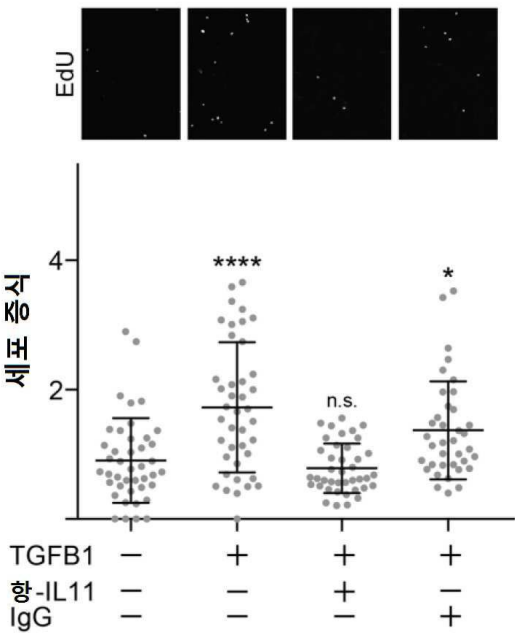
도면21c



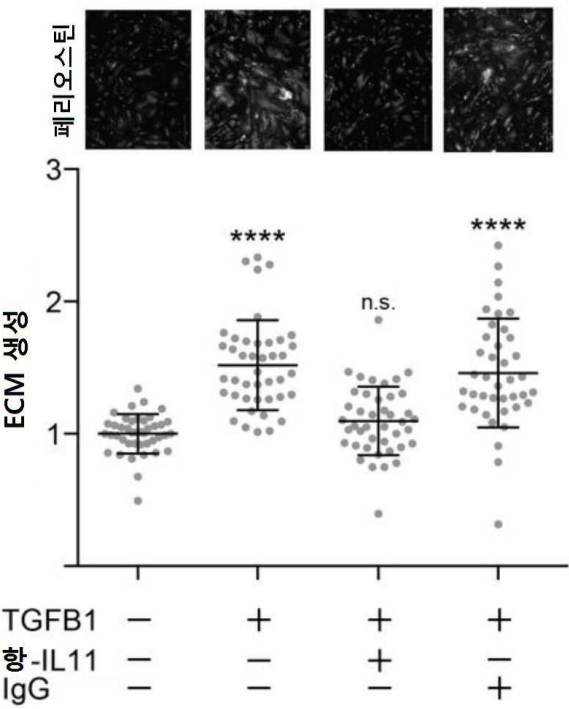
도면22a



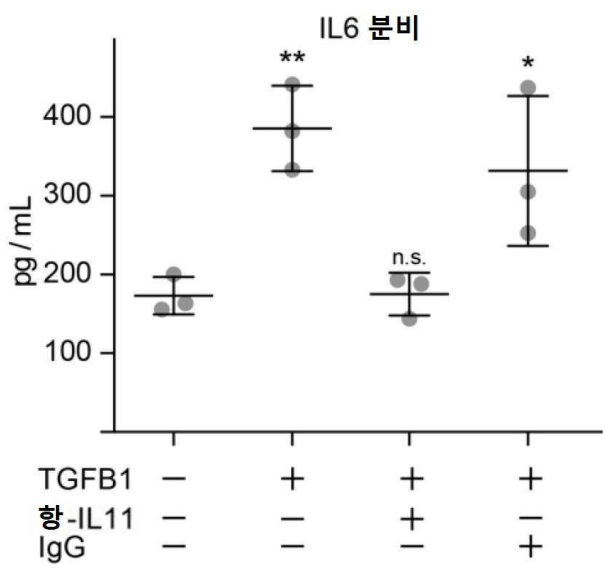
도면22b



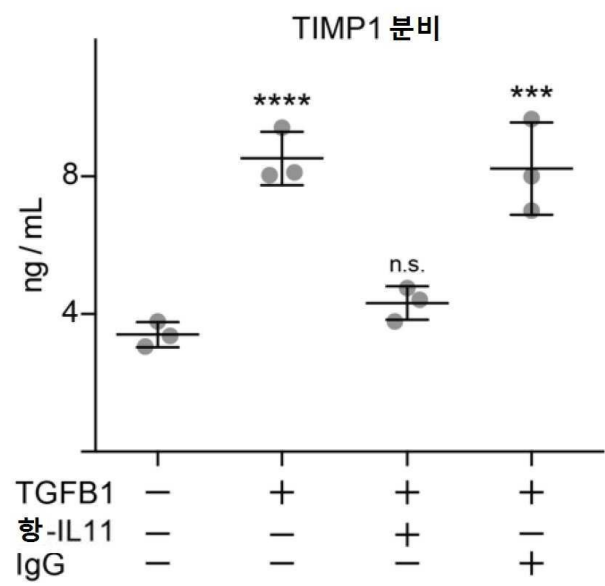
도면22c



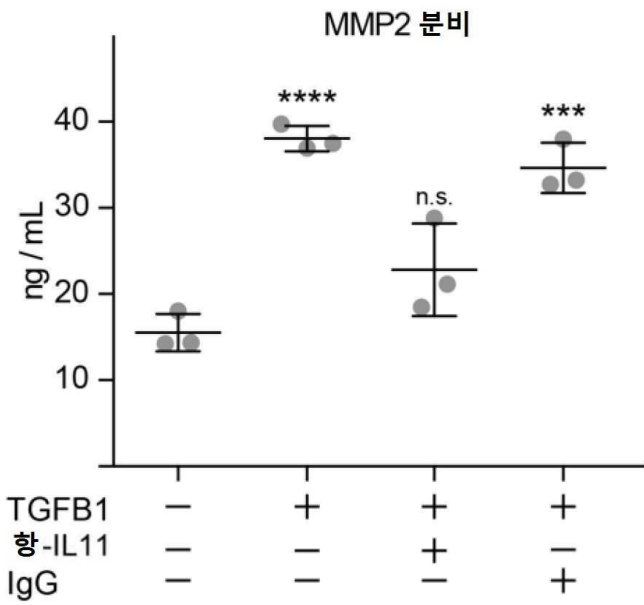
도면22d



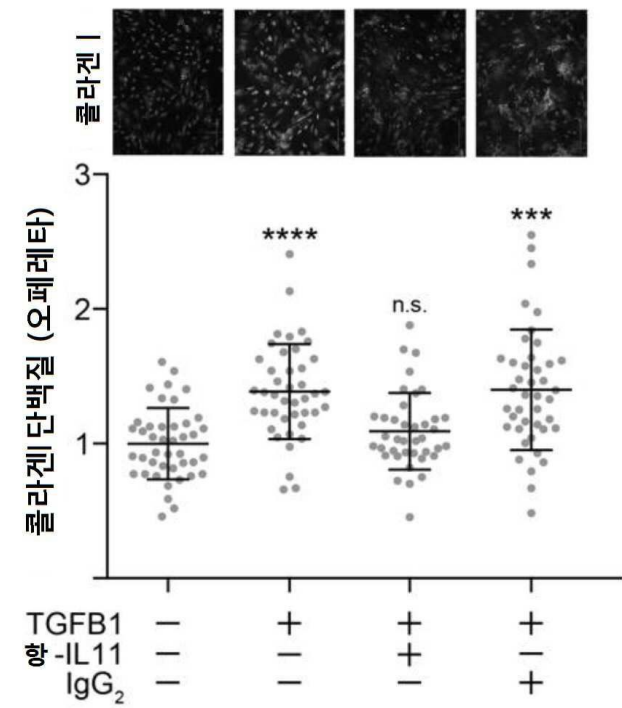
도면22e



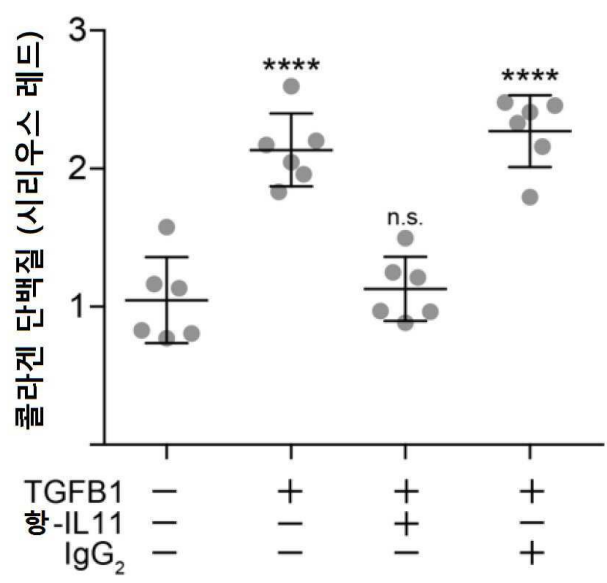
도면22f



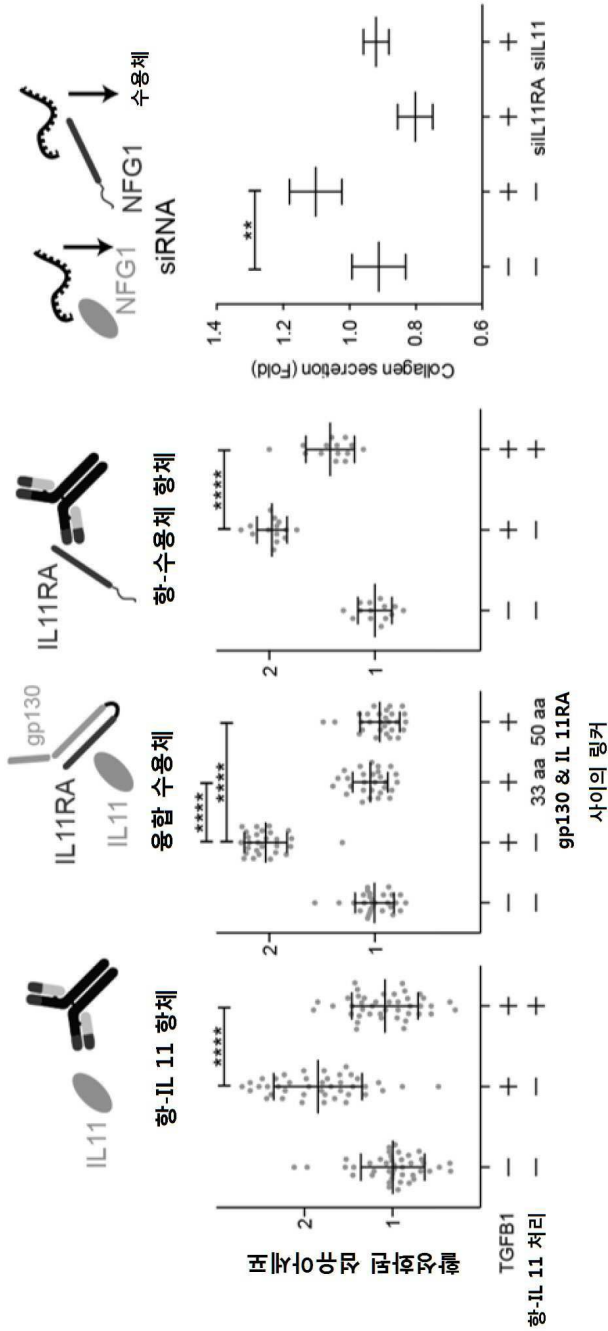
도면23a



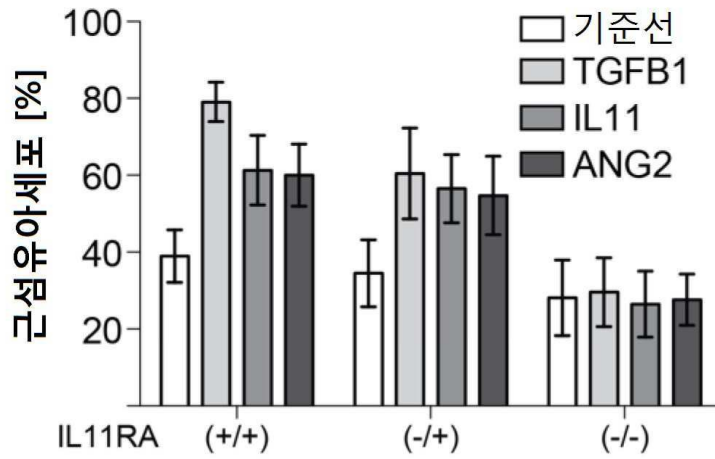
도면23b



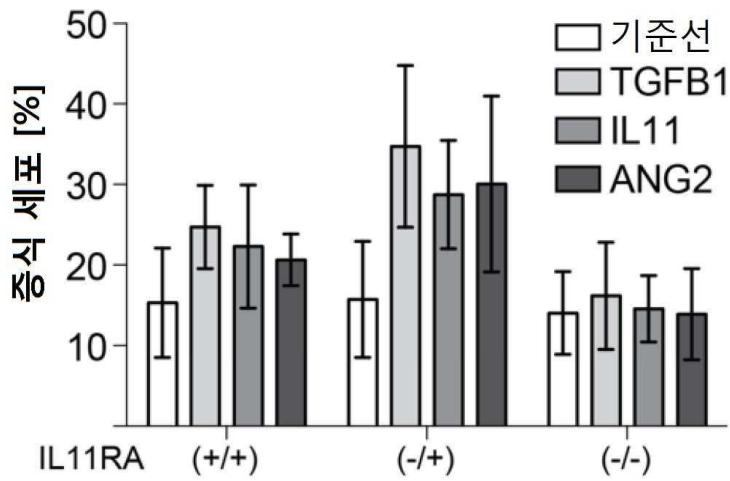
도면24



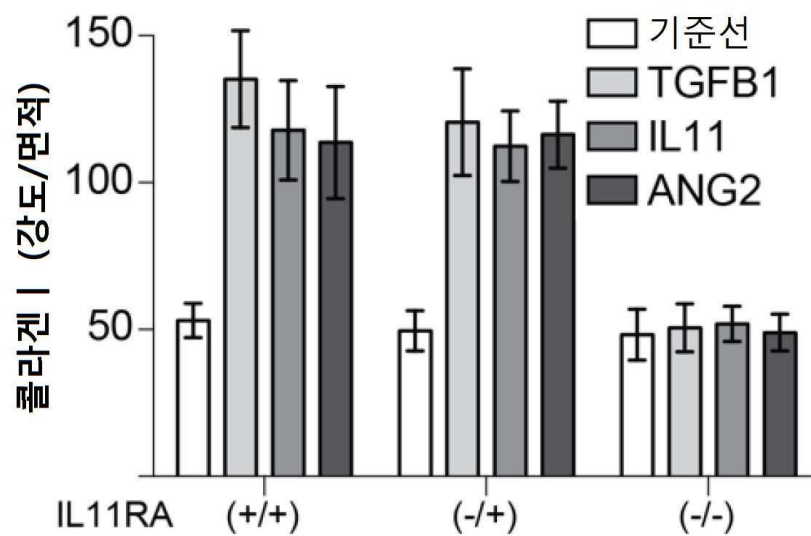
도면25a



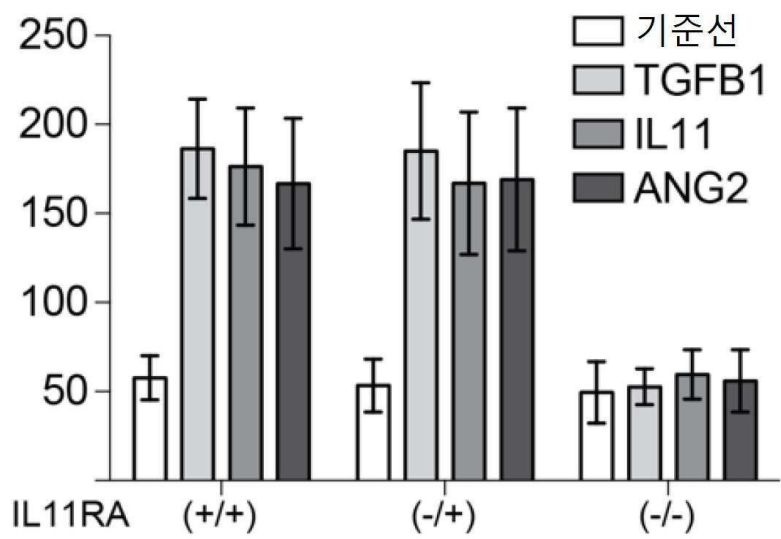
도면25b



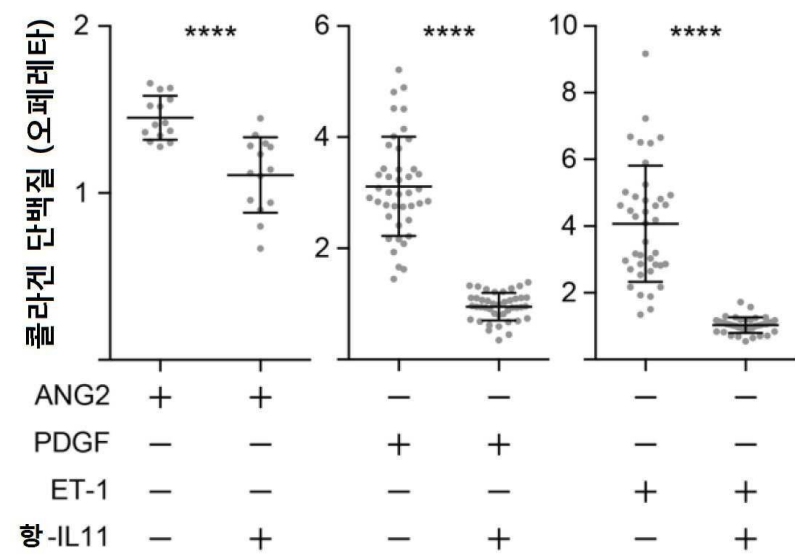
도면25c



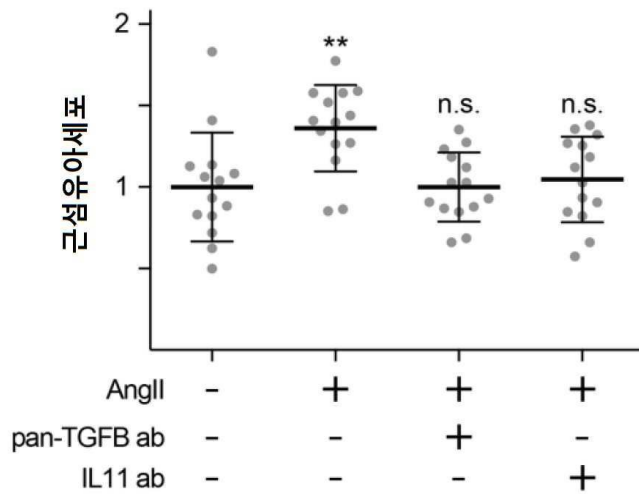
도면25d



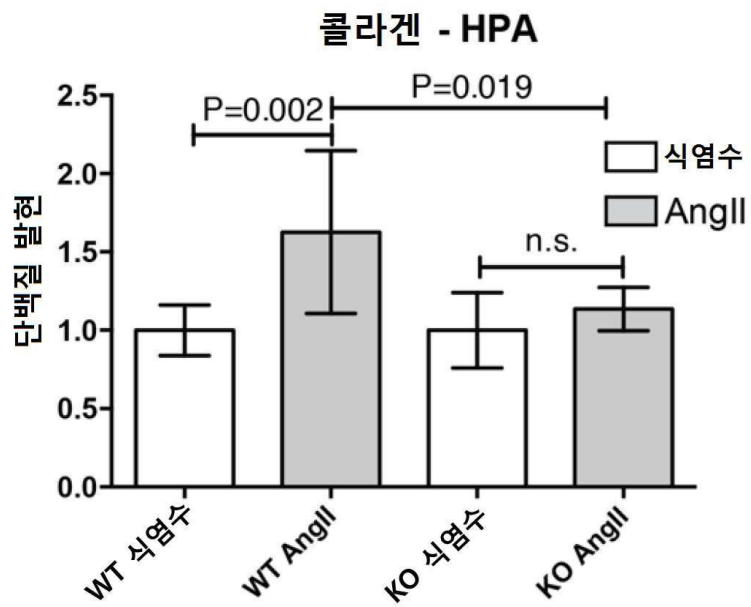
도면26a



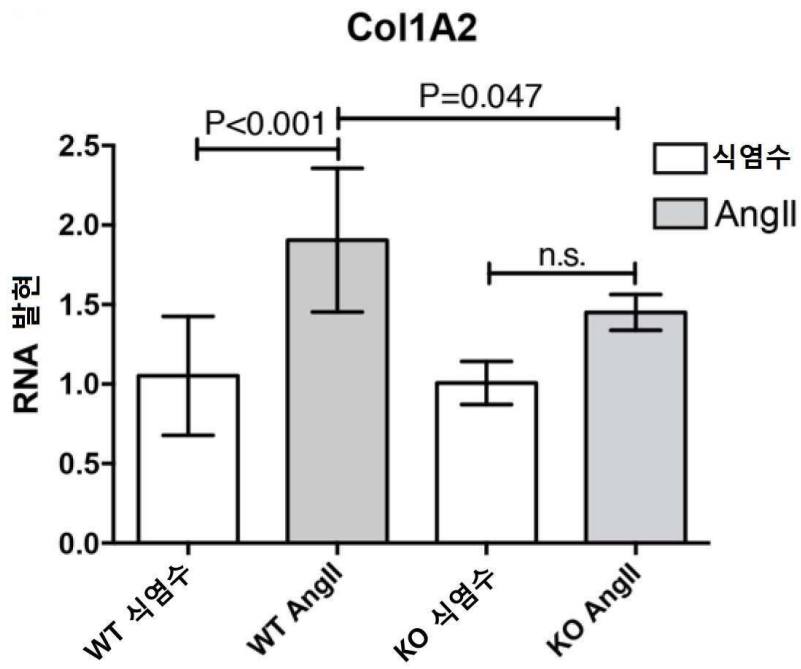
도면26b



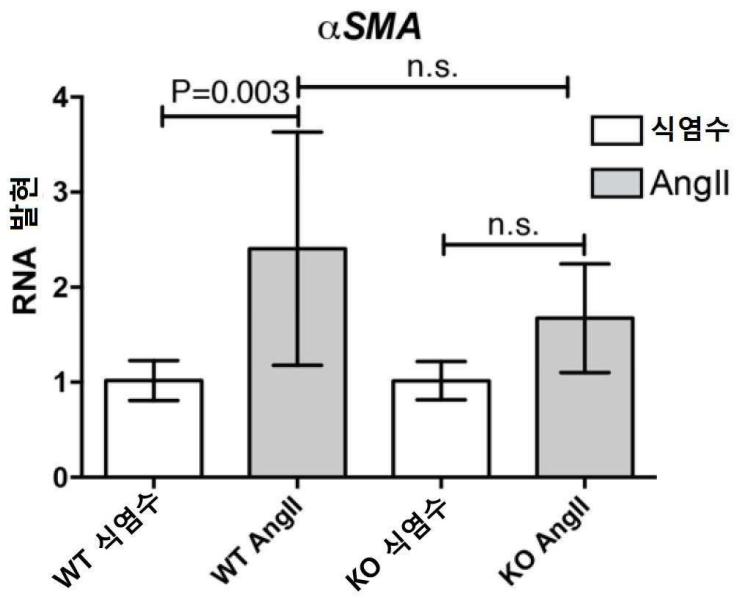
도면27a



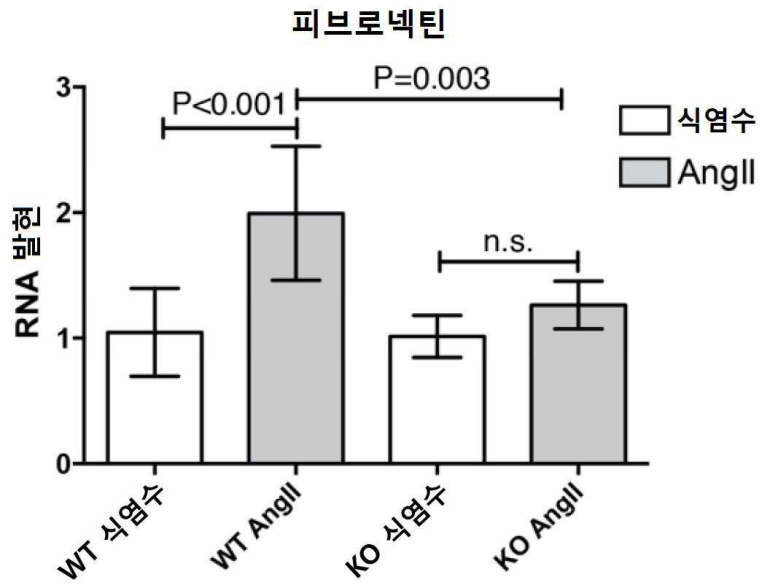
도면27b



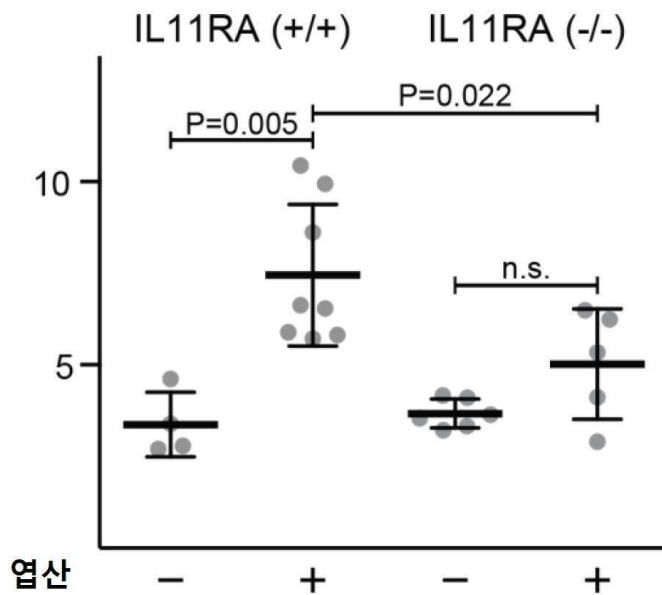
도면27c



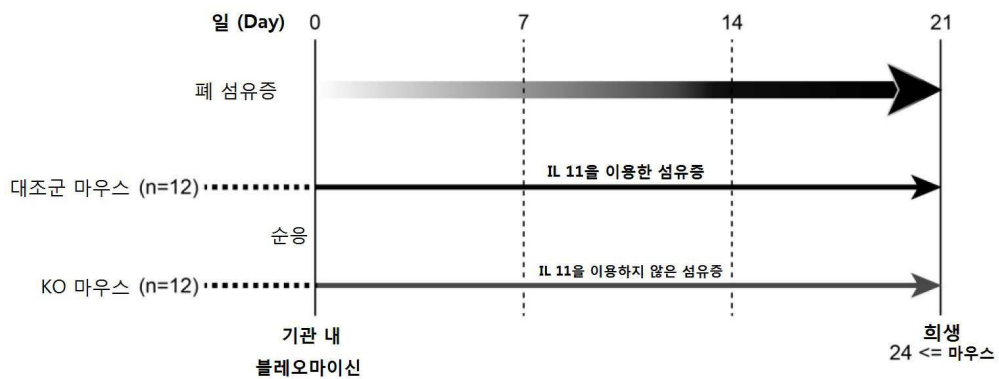
도면27d



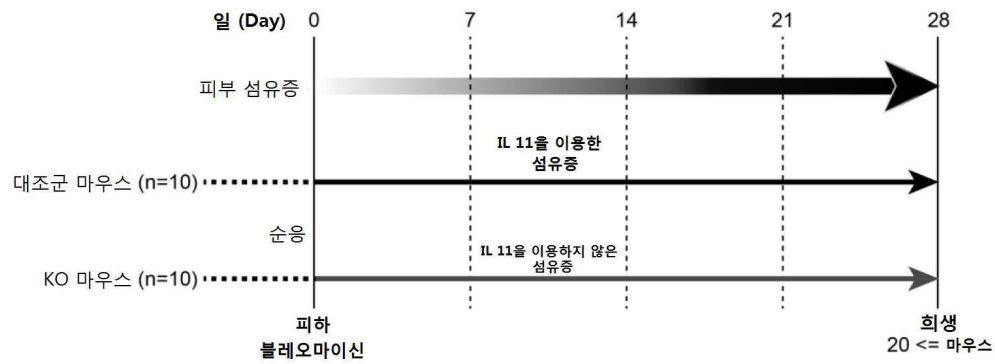
도면28



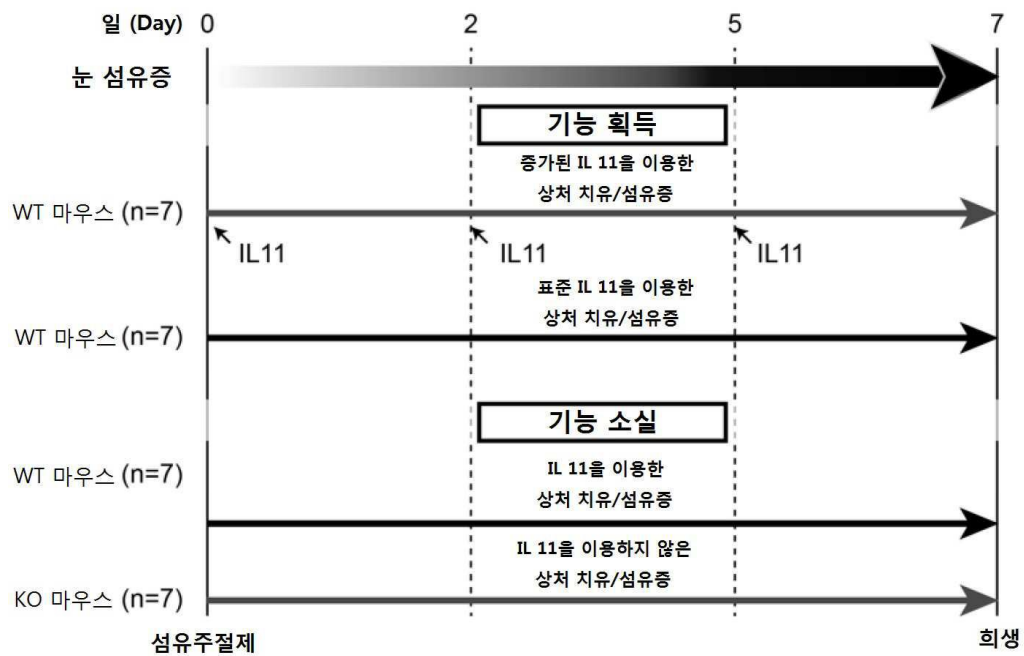
도면29a



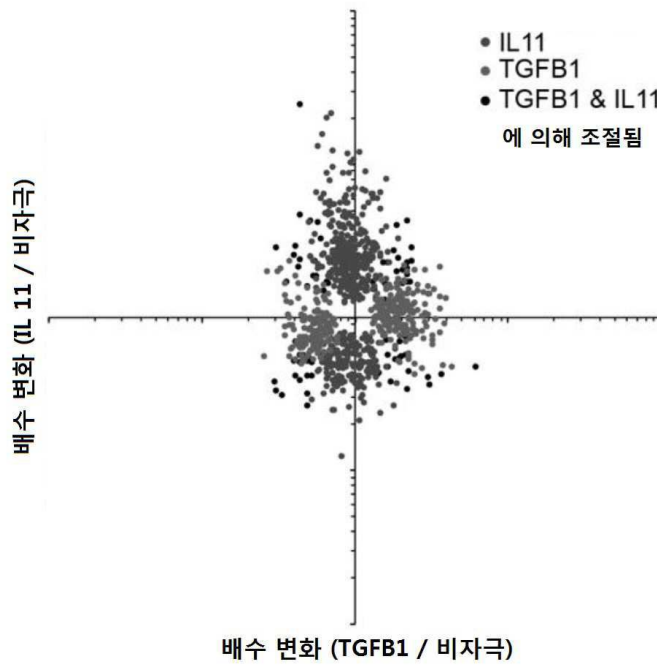
도면29b



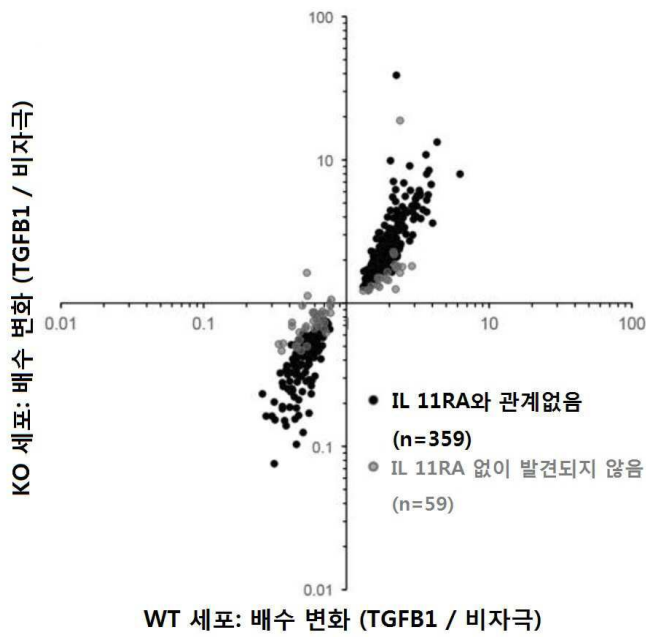
도면29c



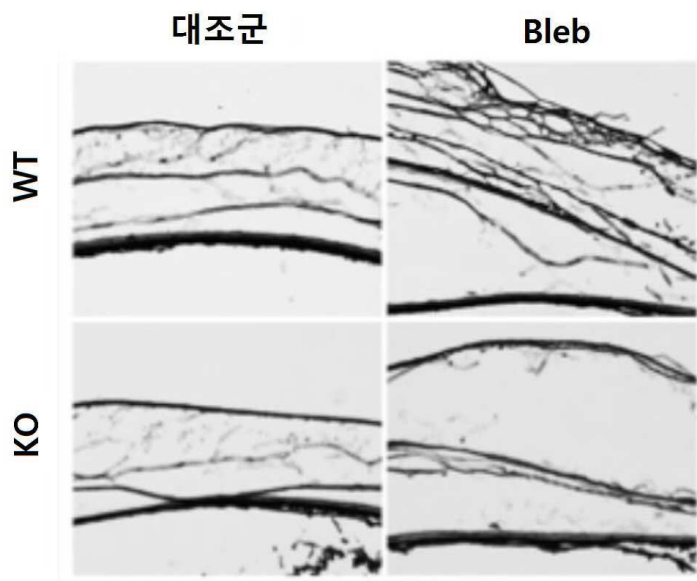
도면30a



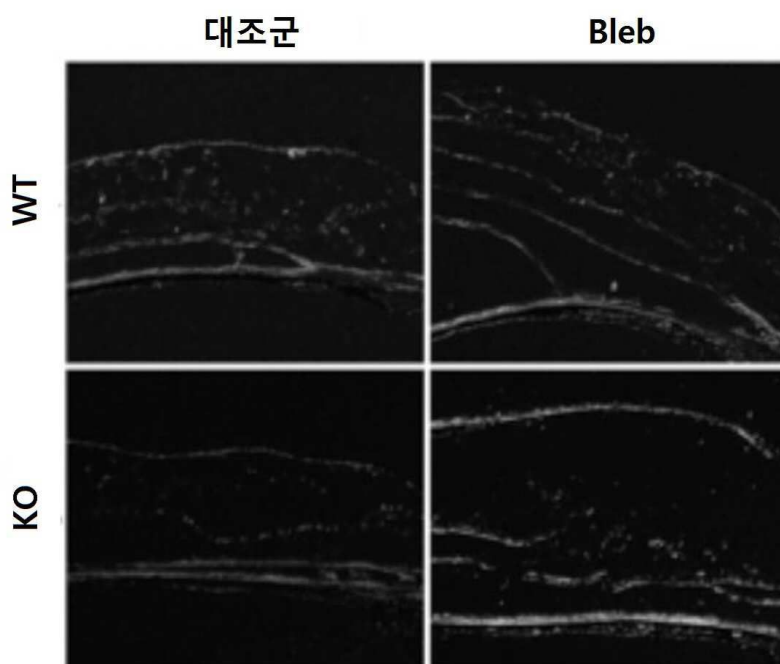
도면30b



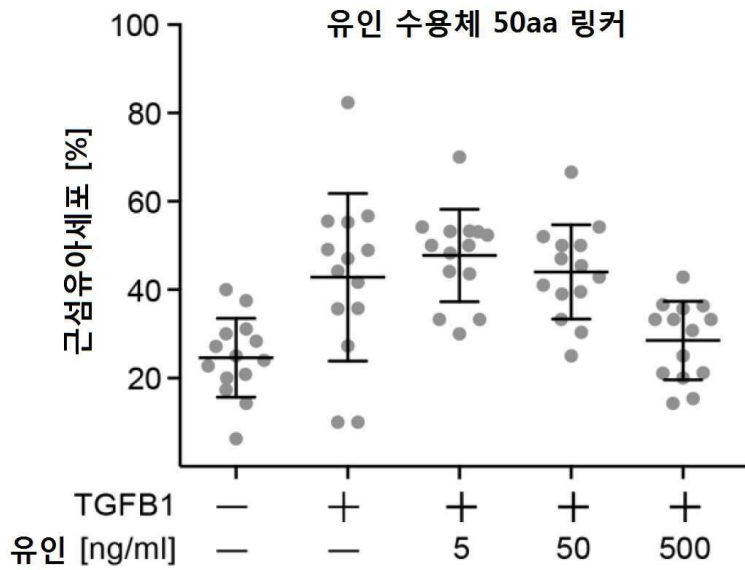
도면31a



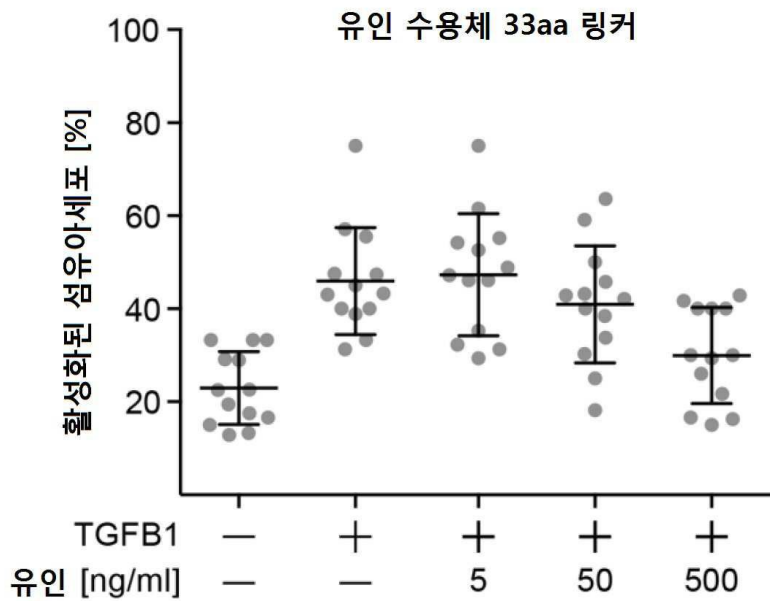
도면31b



도면32a



도면32b



도면33a

SNP ID	위치 (hg19)	P 값	FDR	유전자형	소수 대립유전자	서열	서열번호
rs10831850	11-12566917	1.76E-07	0.0248	G/A	A	GTAAGGGATGTGAATCGGGTACTGA[A/G]GAAAGAG CCTGGATGCAGAGCCAGC	19
rs4756936	11-12599138	1.76E-07	0.0248	C/T	T	TTGATAACTTCAGCATCTGGATCAC[C/T]GTGGGATT AGCATCTGTTTGATTT	20
rs6485827	11-12578182	1.76E-07	0.0248	C/T	C	GTGTGATTGCTTAAAAAACTACT[C/T]ACATTGTTT TGAATCACACCTCACA	21
rs7120273	11-12581045	1.44E-07	0.0248	T/C	T	GCTCAGCTAATCAATGACCACTCTC[C/T]TTAATTCTT CTAATGCCTATATGGT	22
rs895468	2-223621273	2.70E-07	0.0306	G/A	G	GCAGTGCTCAGAAGAGCAGCAGCCA[A/G]TGACATT TTGGGGCTATAAGAGGTA	23

도면34a

SNP ID	위치 (hg19)	P 값	FDR	유전자형	소수 대립유전자	서열	서열번호
rs1000574	19-55114775	0.0432	0.6581	C/T	T	TGTCCAGTAAATACTTAACATTTTA[C/T]GTGCA ATGTATGTCATAAATATGGG	24
rs10403345	19-56741808	0.0355	0.6372	G/A	G	GGgtgaagtttggaaacaggtatcac[A/G]ttgtgatgcaatcgta gaaccaag	25
rs10419994	19-55726220	0.0334	0.6372	C/T	T	aaaccataGTATCATCCTTCCCAA[C/T]AGTCAAC CCAGggaatcacagagat	26
rs10426177	19-56269096	0.0103	0.6372	C/T	T	TAAGACGCTATTCTCTAATTCTGAA[C/T]GGAAG AACTCCTCTCCCAAGACATG	27
rs11084337	19-54916104	0.0370	0.6372	C/T	C	agggtgaacaacacaagggtggg[C/T]gaggcgtgcaattta aacatttct	28
rs11671244	19-56502995	0.0242	0.6372	C/A	A	TATTAGATTTTGTGTGGGATTTCAT[A/C]GTTAC ATTTGTTACCAGCCCAATTT	29
rs11882068	19-56227165	0.0005	0.2204	A/G	G	GATTCCAGTTCCAAGTCACATCATC[A/G]CCAG CTGGAAGACCTAGGGCAAAAG	30
rs12104147	19-54935505	0.0150	0.6372	G/A	A	ACCATGACGGTGTCTCATTGCTTT[A/G]ACCAT TAGTAAtcattcattc	31
rs12608558	19-55715090	0.0275	0.6372	A/G	G	ACCTGTCACATTTTGTGAGCTCCCA[A/G]CCAC CCCCTACCACTGTCCTTATAA	32

도면34b

rs12610132	19-55032293	0.0408	0.6372	A/G	G	GACACGATGTCTTCAGTCTCCAGCT[A/G]AGCT TGGACTGTGAGGATGGGTGAG	33
rs12610617	19-56443519	0.0030	0.3650	C/T	T	CTCTCAAGTTTGCCAGGGGATACG[C/T]GGGA AGTGCCCTGGGGGGCCGACC	34
rs160104	19-56433203	0.0012	0.2352	G/T	T	ctggtctctccagctctggtggt[G/T]ccagtattcttgggtgtggc ctc	35
rs16986899	19-56549510	0.0265	0.6372	T/C	C	AACAAGGTGACAGACCAGGGAGTAA[C/T]GCCT CTCAGTGATGCCCTTGAGAGTC	36
rs17815373	19-56608900	0.0483	0.7007	G/A	A	CGGCAGGCAGTAGGATGGACTGCGT[A/G]GAC GGCGGCCAGCATGTAAATGAAA	37
rs1895375	19-55035001	0.0329	0.6372	T/C	C	AAGTAAGGTGTCAAGGAGGCCATGC[C/T]CACT CTGTAGTTCTAGGAAAGAAT	38
rs2043690	19-56383651	0.0305	0.6372	T/C	T	ATGCCTGAAAGAAACAAGAGCAAAT[C/T]GTCT CAGGAGGTAGGTAATAGGATG	39
rs2194	19-56257259	0.0064	0.5195	G/A	A	AGCATATTATTGATTTCTTACAT[A/G]CAAAT GCTCCTTTTTAAGTGCTCAA	40
rs2288419	19-55693244	0.0140	0.6372	A/G	G	TCAGTACGTATTCTGCATCAGTGC[A/G]TCCT GCGTTCTCCCAACAGTCAGC	41
rs2288521	19-55708557	0.0262	0.6372	T/C	T	AGTGGAGGCCCTGGAACCCGGGACG[C/T]TGT ACAATTTCACCGTGTGGGCAGA	42
rs2288527	19-55699077	0.0454	0.6738	A/G	G	TGCCATATAATCTCAGGGTGCAACG[A/G]ATAA ACAAGGGGTGATGCCGAAGAA	43

도면34c

rs2637107	19-56566741	0.0317	0.6372	G/A	A	CTCTGTCCCCTCAACTCTTTCTAC[A/G]TGGTC ATGTCCCTCTTTAGTTCT	44
rs299164	19-56319796	0.0273	0.6372	A/C	C	GCAACAAAACTTTATACATACCA[A/C]ATGTC TGCTTAGCGGCAGAAATTGCC	45
rs299169	19-56316796	0.0324	0.6372	G/A	G	GCTAGGTAAAGGACTCTGAAAATAC[A/G]GCAA CATGGAAAACATCCAGTCTCC	46
rs303997	19-56424443	0.0007	0.2204	T/C	T	TCCATTTGCCAGTGCAGCATAGCC[C/T]GCAT TGCCAAGGTGGTCTTCCCAAC	47
rs304001	19-56423668	0.0015	0.2352	C/T	C	CGTTTAACAAAGAAGACTGAGAT[C/T]GAGG GCCTGGAAGTGCCCTTCATTG	48
rs304002	19-56423254	0.0141	0.6372	C/T	C	TTCTACGACTTTTCTACTGCCTACA[C/T]GAGTC CCAGGAGGAAGACTTCACAA	49
rs306463	19-56497077	0.0068	0.5195	T/G	T	gccaaatgtgttgaaaattccatt[G/T]gaagaattatggtgaatgc at	50
rs310445	19-56173551	0.0396	0.6372	G/A	G	GAAGATTGTTCAAGAAAAGGCAGAG[A/G]GCAT GATGACACACAAAATGAAGA	51
rs3745429	19-54937593	0.0233	0.6372	A/G	G	CCTGGGACTATCCCCTGGCCGGGCC[A/G]CAC ACATGTGCCCTGTGACCAAGGA	52
rs3786867	19-55684200	0.0394	0.6372	C/T	T	GCTGGCTGTGAGGAGTCCGCGAGAA[C/T]TCC CTTGCTTGCCATGAATTTATC	53
rs4629084	19-56420157	0.0243	0.6372	G/T	G	AAGGTGAAGAGTGGGAAAAGGCAGA[G/T]GATC AGGAAAATAACTAATGGGTA	54

도면34d

rs464765	19-56430224	0.0208	0.6372	A/C	A	ggcttaataaaaggaattagagagc[A/C]ctccctctctccaacat cttttic	55
rs4801278	19-56246520	0.0268	0.6372	G/A	A	TGGTCTGTGCTCTCCTTGCACACTC[A/G]TCTGT GGACATCACAGGAGGGAACA	56
rs4801635	19-56372705	0.0352	0.6372	C/T	C	GTGCGTATATGTGTTACAAGTGGCT[C/T]GTGTT GACCGCCTGCCTGTGGAAG	57
rs516022	19-56609371	0.0408	0.6372	C/A	C	GCCTCGGGTGCTGACCGGGGGTGCC[A/C]TTG CTGGGCTTAGCAGGCCGGGCTT	58
rs6509882	19-55030183	0.0400	0.6372	A/G	G	TGATGTGCCACATCCTGTATAGGAA[A/G]CAGG TGATGTGGAATGAGTCAGAC	59
rs6509883	19-55030376	0.0378	0.6372	A/G	G	CATGAAAACCCCTCAGATGGTACCA[A/G]AAAT ATAGACAATTGATCCAGAGAG	60
rs6509933	19-55683104	0.0188	0.6372	T/C	T	gtccagctactcacacaggaggat[C/T]gcaggagtttgaacc agcctgtgc	61
rs6509939	19-55851708	0.0337	0.6372	T/C	C	CACCCTCAGGGCCTCTCCCTGACCC[C/T]TCTC TCACCCCGGGACCTCCCTGC	62
rs8110255	19-56568978	0.0045	0.4527	T/C	C	GCAGGTCTGTGTTCTTGTATGTT[C/T]CCTTG CTACAGGCACTCTCAGCCTT	63
rs8112791	19-56723492	0.0236	0.6372	C/A	C	gtcagtttgaacaggtaaaatca[A/C]aatgctcatgtctctaca gggaaa	64
rs873732	19-56745520	0.0194	0.6372	G/A	A	AGCCAATTCGTCAAGTGAATGAGGCA[A/G]AGAA ATTGGTAAAAAGAGGAAAGT	65

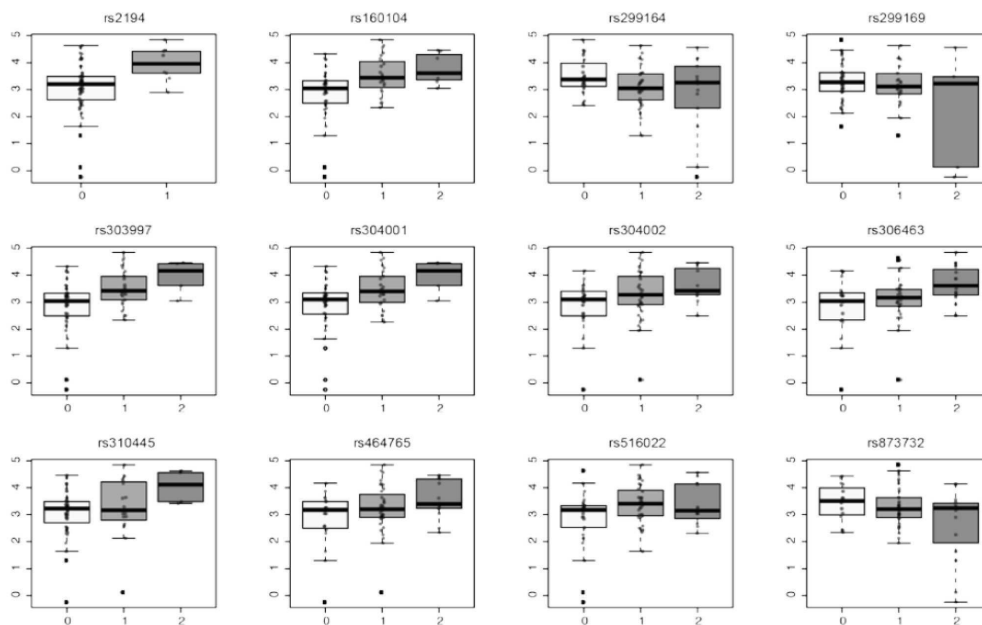
도면35a

SNP ID	위치 (hg19)	P 값	FDR	유전자형	소수 대립유전자	서열	서열번호
rs2823699	21-17628689	1.62E-08	0.0033	T/C	T	TACATAGTAGGCTTAAGAGCAAATG[C/T]CTACC TTTTCTCTGTTTTCAACTC	66
rs4973978	3-41667545	1.69E-08	0.0033	T/G	G	GTTGGTTGGTTTGTTCCTTTAA[G/T]GGTGC CATTTAATGACAGATTTTCAT	67
rs11744285	5-124622296	1.75E-08	0.0033	A/G	G	GCCCCGGTGACAAGAATGGCAAAC[A/G]TTTA TTCGGCATTACAATGTGTAA	68
rs7120273	11-12581045	3.32E-08	0.0041	T/C	T	GCTCAGCTAATCAATGACCAGTCTC[C/T]TTAAT TCTTCTAATGCCTATATGGT	69
rs10831850	11-12566917	5.12E-08	0.0041	G/A	A	GTAAGGGATGTGAATCGGGTACTGA[A/G]GAAA GAGCCTGGATGCAGAGCCAGC	70
rs4756936	11-12599138	5.12E-08	0.0041	C/T	T	TTGATAACTTCAGCATCTGGATCAC[C/T]GTGG GATTAGCATCTGTTGTATTT	71
rs6485827	11-12578182	5.12E-08	0.0041	C/T	C	GTGTGATTGCTTAAAAAACTACT[C/T]ACATT GTTTTGAATCACACCTCACA	72

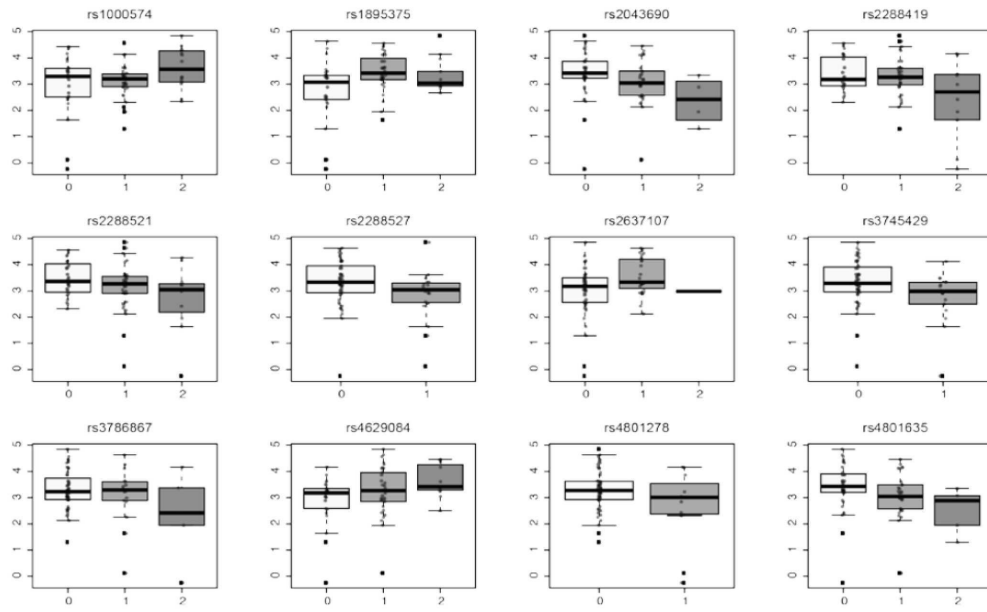
도면35b

rs7079768	10-131271870	9.92E-08	0.0070	G/A	A	ACTTGTGCCAGGCTGGCTTTGCAAC[A/G]ATGA GCCTGAGAAAGCTGTTAGAAGT	73
rs1293764	12-113425679	1.27E-07	0.0080	A/G	A	GAGACACAAGAGGTGGGCAGGTCTT[A/G]GGG ATTTAGGAGTTGGGTCAAGGC	74
rs1862945	7-50936184	6.84E-07	0.0387	G/A	A	TGAGTCTGTGAGGAGAAATGAACAA[A/G]TCTA CCACAGTCATCCAGAATGAGA	75
rs10496038	2-55340963	9.41E-07	0.0484	C/T	T	ATCAGAAGGCTAAGGAACCACTGT[C/T]TAATA GTCTGGTGCCAAACACAGGC	76
rs12669489	7-50961697	1.05E-06	0.0493	G/A	A	catcaataagaaaaacaaaaataat[A/G]taatagaaaatgc aagagactt	77

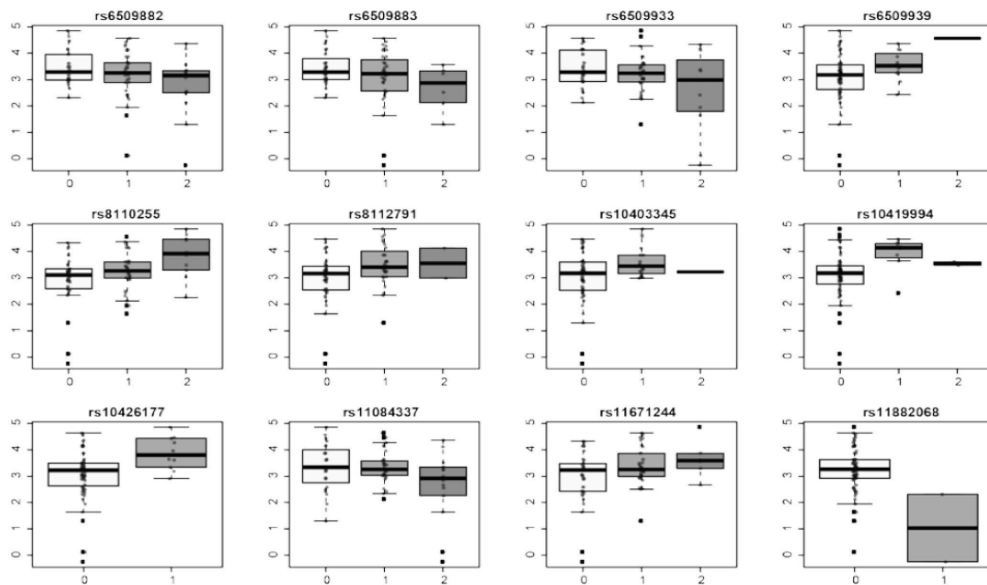
도면36a



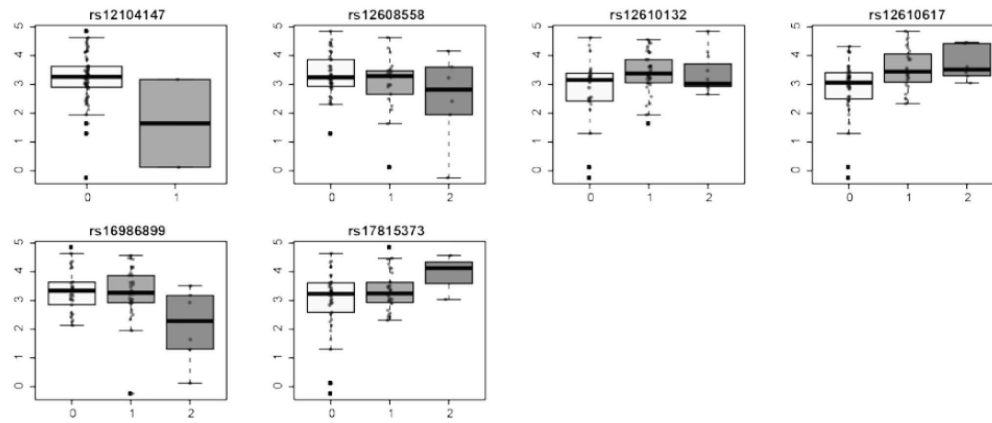
도면36b



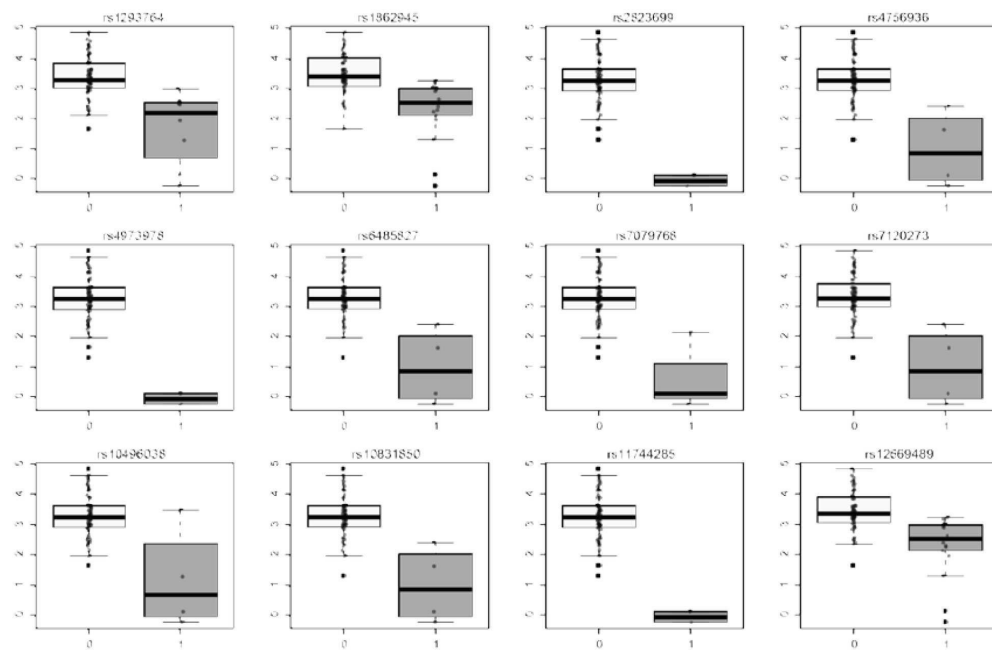
도면36c



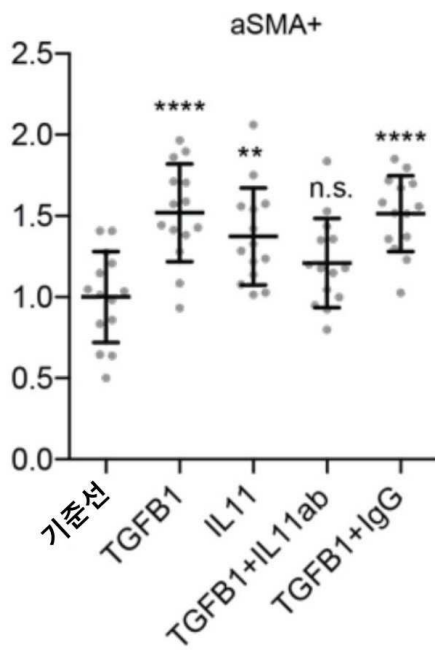
도면36d



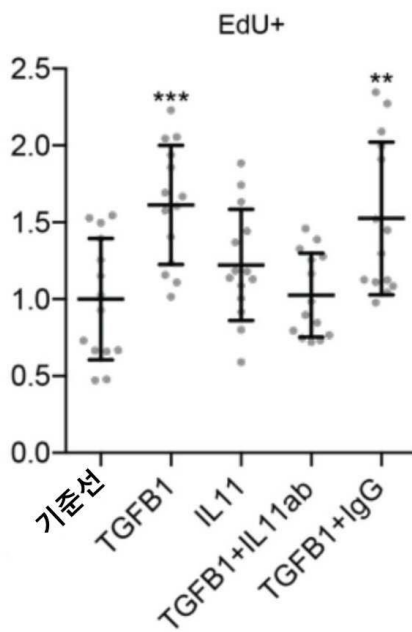
도면37



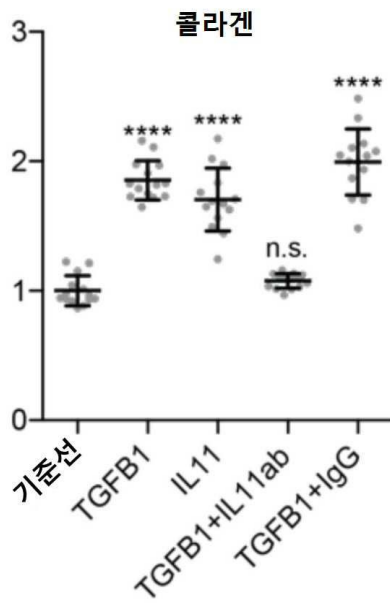
도면38a



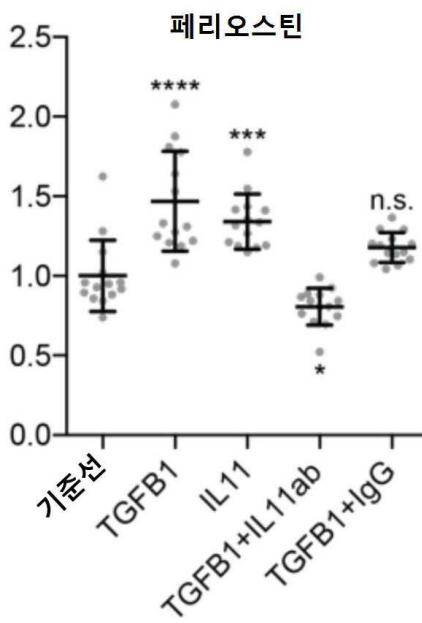
도면38b



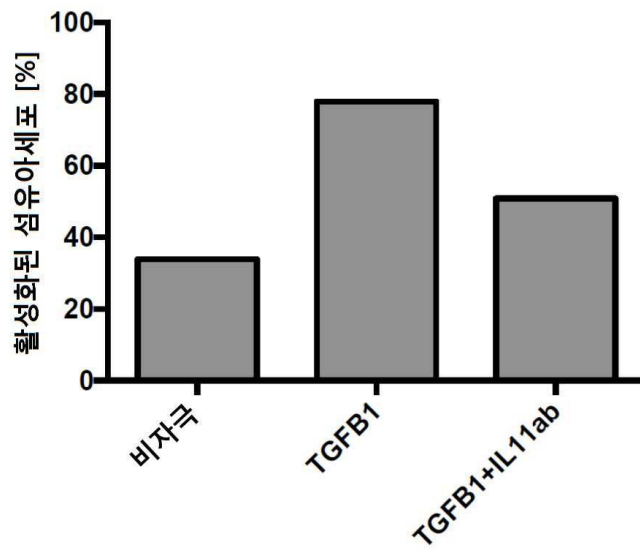
도면38c



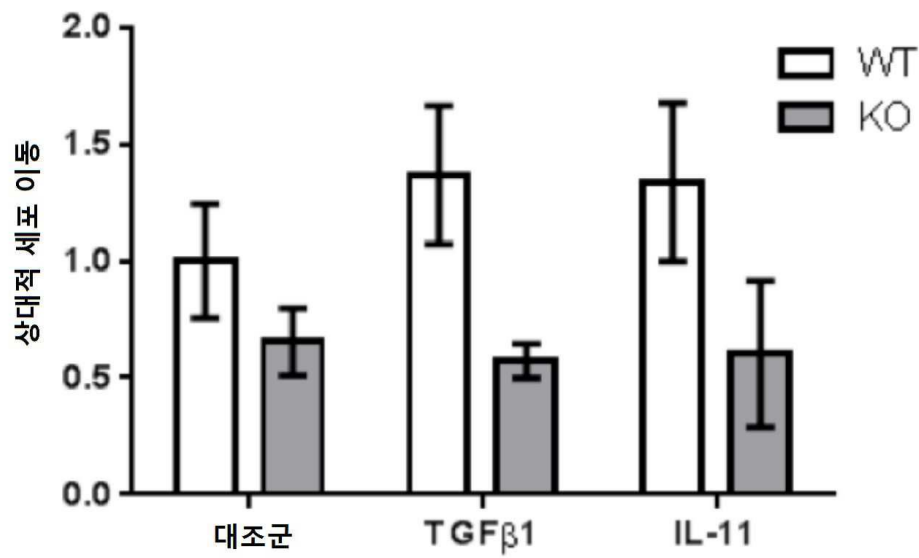
도면38d



도면39



도면40



서열 목록

SEQUENCE LISTING

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

<120> Treatment of Fibrosis

<130> RIC/FP7164916

<150> GB1522186.4

<151> 2015-12-16

<160> 77

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

actgccgcgg cctgtctgt cagggcacat gcctccctc cccaggccgc ggcccagctg      60
accctcgggg ctccccggc agcggacagg gaagggttaa agggccccgg ctccctgccc      120
cctgccctgg ggaaccctg gccctgtggg gacatgaact gtgtttgccg cctggtcctg      180

gtcgtgctga gcctgtggcc agatacagct gtcgccccg ggccaccacc tggccccct      240
cgagtttccc cagaccctcg ggccgagctg gacagcaccc tgctcctgac ccgtctctc      300
ctggcggaca cgcggcagct ggctgcacag ctgagggaca aattcccagc tgacggggac      360
cacaacctgg attccctgcc caccctggcc atgagtgcgg gggcactggg agctctacag      420
ctcccagggt tgctgacaag gctgcgagcg gacctactgt cctacctgcg gcacgtgcag      480
tggctgcgcc gggcagggtg ctcttccctg aagaccctgg agcccagct gggcacctg      540
caggccccgac tggaccggct gctgcgccgg ctgcagctcc tgatgtcccg cctggccctg      600

ccccagccac ccccggaacc gccggcgccc ccgtggcgc cccctcctc agcctggggg      660
ggcatcaggg ccgccacgc catcctgggg gggtgcacc tgacacttga ctgggccgtg      720
aggggactgc tctgtctgaa gactcggtg tgaccggggg cccaaagcca ccaccgtct      780
tccaaagcca gatcttattt atttatttat ttcagtactg ggggcgaaac agccagggtga      840
tcccccgcc attatctccc cctagttaga gacagtcctt ccgtgaggcc tggggggcat      900
ctgtgcctta ttatactta ttattttcag gacgaggggt gggaggcagg tggactcctg      960
ggtccccgag gaggagggga ctggggtccc ggattcttgg gtcctcaaga agtctgtcca      1020

cagacttctg ccttggtct tccccatcta ggctgggca ggaacatata ttatttattt      1080
aagcaattac ttttcatgtt ggggtgggga cggaggggaa agggaagcct gggtttttgt      1140
acaaaaatgt gagaaacctt tgtgagacag agaacaggga attaaatgtg tcatacatat      1200
ccacttgagg gcgatttgc tgagagctgg gctggatgc ttgggtaact ggggcagggc      1260
aggtggaggg gagacctcca ttcagggtga ggtcccagat gggcggggca gcgactggga      1320
gatgggtcgg tcaccacag agctctgttg aggcagggtc tgagccttgc ctggggcccc      1380
gcactgcata gggccttttg tttgtttttt gagatggagt ctcgtctgtg tgcctaggt      1440

ggagtgcagt gaggcaatct gaggtcactg caacctccac ctcccgggtt caagcaattc      1500

```

tcctgcctca gcctcccgat tagctgggat cacaggtgtg caccacatg cccagcta	1560
tatttatttc ttttgtattt ttagtagaga cagggtttca ccatgttgcc caggctggtt	1620
tcgaactcct gacctcaggt gatcctcctg cctcggcctc ccaaagtgt gggattacag	1680
gtgtgagcca ccacaccta cccataggtc ttcaataaat atttaattga aggttccaca	1740
agtcaccctg tgatcaacag taccctatg ggacaaagct gcaaggtcaa gatggttcat	1800
tatggctgtg ttcacatag caaactggaa acaatctaga tatccaacag tgagggttaa	1860
gcaacatggt gcatctgtgg atagaacgcc acccagccgc ccggagcagg gactgtcatt	1920
caggagggt aaggagagag gcttgcttgg gatataaaaa gatatacctga cattggccag	1980
gcatggtggc tcacgcctgt aatcctggca ctttgggagg acgaagcgag tggatcactg	2040
aagtccaaga gttcgagacc ggcctgcgag acatggcaaa accctgtctc aaaaaagaaa	2100
gaatgatgtc ctgacatgaa acagcaggct acaaaaccac tgcatgctgt gatccaatt	2160
ttgtgttttt ctttctatat atggattaaa acaaaaatcc taaagggaac tacgcaaaa	2220
tgttgacaat gactgtctcc aggtcaaagg agagaggtgg gattgtgggt gactttta	2280
gtgtatgatt gtctgtattt tacagaattt ctgcatgac tgtgtatttt gcatgacaca	2340
ttttaaaat aataaacact atttttagaa taacagaaaa a	2381
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
ccttcaaag ccagatctt	19
<210> 3	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
gcctgggcag gaacatata	19
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	

cctgggcagg aacatatat 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggttcattat ggctgtgtt 19

<210> 6

<211> 1696

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gctgtagctg gtgagaggaa gtcctagagg ctatggacac tctgctgctg ggatcaccga 60

gatgagcagc agctgctcag ggctgagcag ggtcctgggt gccgtggcta cagccctggt 120

gltcgctcc tccccctgcc cccaggcctg gggcccccca ggggtccagt atgggcagcc 180

agggaggtcc gtgaagctgt gttgtcctgg agtgactgcc ggggaccag tgcctggtt 240

tcgggatggg gagccaaagc tgctccaggg acctgactct gggctagggc atgaactggt 300

cctggcccag gcagacagca ctgatgaggg cacctacatc tgccagacc tggatggtgc 360

acttgggggc acagtgacc tgcagctggg ctaccctcca gcccgcctg ttgtctcctg 420

ccaagcagcc gactatgaga acttctcttg cacttggagt cccagccaga tcagcggttt 480

acccaccgc tacctacct cctacaggaa gaagacagtc ctaggagctg atagccagag 540

gaggagtcca tccacagggc cctggccatg cccacaggat cccctagggg ctgcccgctg 600

tgttgtccac ggggctgagt tctggagcca gtaccggatt aatgtgactg aggtgaaccc 660

actgggtgcc agcacagcc tgctggatgt gagcttgacag agcatcttc gcctgaccc 720

accccagggc ctgcgggtag agtcagtacc aggttaccce cgacgcctgc gagccagctg 780

gacataccct gcctcctggc cgtgccagcc ccacttctg ctcaagttcc gtttgagta 840

ccgtccggcg cagcatccag cctggtccac ggtggagcca gctggactgg aggagtgat 900

cacagatgct gtggctgggc tgccccatgc tgtacgagtc agtgcccggg actttctaga 960

tgctggcacc tggagcacct ggagcccga ggctgggga actccgagca ctgggacat 1020

accaaaggag ataccagcat ggggccagct acacacgcag ccagaggtgg agcctcaggt 1080

ggacagccct gtcctccaa ggccctccct ccaaccacac cctcggtac ttgatcacag 1140

ggactctgtg gagcaggtag ctgtgctggc gtctttggga atcctttctt tcctgggact 1200

ggtggctggg gccctggcac tggggctctg gctgaggctg agacggggtg ggaaggatgg	1260
atccccaag cctgggttct tggcctcagt gattccagtg gacaggcgtc caggagctcc	1320
aaacctgtag aggacccagg agggcttcgg cagattccac ctataattct gtcttgctgg	1380
tgtggataga aaccaggcag gacagtagat ccctatggtt ggatctcagc tggagttct	1440
gtttggagcc catttctgtg agaccctgta ttcaaattt gcagctgaaa ggtgcttgta	1500
cctctgattt caccacagag ttggagttct gctcaaggaa cgtgtgtaat gtgtacatct	1560
gtgtccatgt gtgacctgt gtctgtgaag gccagggaac atgtattcct ctgcatgcat	1620
gtatgtaggt gcctgggagt gtgtgtggtc ctgtctctgg ccctttccct tgcagggttg	1680
tgcaggtgtg aataaa	1696
<210> 7	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
ggaccatacc aaaggagat	19
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 8	
gcgtcttttg gaatccttt	19
<210> 9	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	
gcaggacagt agatccct	18
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
gctcaaggaa cgtgtgtaa	19

<210> 11
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature

 <222> (20)..(21)
 <223> n = deoxythymidine
 <400> 11
 ccuuccaaag ccagauuun n 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = deoxythymidine
 <400> 12
 gccugggcag gaacauuan n 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = deoxythymidine
 <400> 13
 ccugggcagg aacauuaun n 21

 <210> 14
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)


```

<223> n = deoxythymidine
<400> 14
gguucauuau ggcuguguun n 21
<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deoxythymidine
<400> 15
ggaccauacc aaaggagaun n 21
<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<220><221>
> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deoxythymidine
<400> 16
gcgucuuugg gaauccuun n 21
<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deoxythymidine
<400> 17
gcaggacagu agaucccuan n 21
<210> 18
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220><221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = deoxythymidine
<
400> 18
gcucaaggaa cguguguaan n 21
<210> 19
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = G or A
<400> 19
gtaagggatg tgaatcgggt actgangaaa ggcctggat gcagagccag c 51
<210> 20
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C or T
<400> 20
ttgataactt cagcatctgg atcacngtgg gattagcatc tgtttgtatt t 51

<210> 21
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C or T
<400> 21
gtgtgattgc ttaaaaaaa ctactnecat tgttttgaat cacacctcac a 51
<210> 22

```

<211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C
 <400> 22
 gctcagctaa tcaatgacca gtctcnttaa ttctttctaata gcctatatgg t 51
 <210> 23
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 23
 gcagtgtca gaagagcagc agccantgac attttggggc tataagaggt a 51
 <210> 24
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or T
 <400> 24
 tgtccagtaa atacttaaca ttttangtgc aatgtatgtc ataaatatgg g 51
 <210> 25
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 25

gggtgaagtt tggaaacagg tatacnttgt gatgcaatcg tcagaaccaa g 51

<210> 26

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C or T

<400> 26

aaaccatagt atcatccttc ccaaanagtc aaccagga atcacagaga t 51

<210> 27

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C or T

<400> 27

taagacgcta ttctctaatt ctgaangaa gaactcctct cccaagacat g 51

<210> 28

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C or T

<400> 28

aggtggaaca acacaaaggg tgggngagg cgtgcaattt aaacattttc t 51

<210> 29

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)
 <223> n = C or A
 <400> 29
 tattagattt tgggtgggat ttcatngtta catttggtac cagcccaatt t 51
 <210> 30
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 30
 gattccagtt ccaagtcaca tcatcnccag ctggaagacc tagggcaaaa g 51
 <210> 31
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 31
 accatgacgg tgtcctcatt gcttnacca ttagtaatca ttcattcatt c 51
 <210> 32
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 32
 acctgtcaca tttgtgcagc tccanccac cccctaccac tgtccttata a 51
 <210> 33
 <211> 51
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 33
 gacacgatgt cttcagtctc cagctnagct tggactgtga ggatgggtca g 51
 <210> 34
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or T
 <400> 34
 ctctcaagtt tgcccagggg atacngggga agtgcccctg gggggccgac c 51
 <210> 35
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or T
 <400> 35
 ctggtctctt ccagctctgg tggctnccag tatttcttgg gttgtgcct c 51
 <210> 36
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C
 <400> 36
 aacaaggtga cagaccaggg agtaangcct ctcagtgatg ccttgagagt c 51

<210> 37
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 37
 cggcaggcag taggatggac tgcgtngacg gcggccagca tgtaaatgaa a 51
 <210> 38
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C
 <400> 38
 aagtaagggtg tcaaggaggc catgcncact ctgtaggttc taggaaagaa t 51
 <210> 39
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C
 <400> 39
 atgcctgaaa gaaacaagag caaatngtct caggaggtag gtaataggat g 51
 <210> 40
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G

<400> 40
agcatattca ttgatttcct tacatncaaa tgctcctttt taagtgtca a 51

<210> 41
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = A or G
<400> 41
tcagtacgta ttctgcatc agtgctcct gcggttcctc caacagtcag c 51

<210> 42
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = C or T
<400> 42
agtggaggcc ctggaaccgc ggacgntgta caatttcacc gtgtgggcag a 51

<210> 43
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = A or G
<400> 43
tgccatataa tctcagggtg caacgnataa acaagggtg atgccgaaga a 51

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

<220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 44
 ctctgtcccc tcaacttctt tctacntggt catgtccctt ctttagttcc t 51
 <210> 45
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or C
 <400> 45
 gcaacaaaaa tcttatacat caccanatgt ctgcttagcg gcagaattgc c 51

 <210> 46
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 46
 gctaggtaaa ggactctgaa aatacngcaa catggaaaac atccagtctc c 51
 <210> 47
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C
 <400> 47
 tccatttgcc cagtgcagca tagccngcat tgccaagggtg gtcttcccaa c 51
 <210> 48
 <211> 51

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature

 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or T
 <400> 48
 cgtttaacaa agaagacact gagatngagg gcctggaagt gcctttcatt g 51
 <210> 49
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or T
 <400> 49
 ttctacgact ttttcactgc ctacangagt cccaggagga agacttcaca a 51
 <210> 50
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or T
 <400> 50
 gccaaatgtg tttagaaatt ccatngaag aatttatggt gaatgcattt t 51

 <210> 51
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 51

gaagattgtt caagaaaagg cagagngcat gatgacaaca caaatgaag a 51

<210> 52

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = A or G

<400> 52

cctgggacta tcccctggcc gggccncaca catgtgccct gtgaccaggg a 51

<210> 53

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = C or T

<400> 53

gctggctgtg aggagtccgc gagaantccc ttgcttgctc atgaatttat c 51

<210> 54

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = G or T

<400> 54

aaggtgaaga gtgggaaaag gcagangatc aggaaaaata actaatgggt a 51

<210> 55

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = A or C
 <400> 55
 ggcttaataa aaggaattag agagcncctcc ctctctcca acatcttttt c 51

 <210> 56
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 56
 tggtctgtgc tctccttgca cactcntctg tggacatcac aggaggaac a 51

 <210> 57
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or T
 <400> 57
 gtgcgtatat gtgttacaag tggctngtgt tgaccgcctg cctgtggaaa g 51

 <210> 58
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature

 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or C
 <400> 58
 gcctcgggtg ctgaccgggg gtgcenntgc tgggcttagc aggccgggct t 51

 <210> 59
 <211> 51
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 59
 tgatgtgccca catcctgtat aggaancagg tgatgtggaa atgagtcaga c 51
 <210> 60
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 60
 catgaaaacc cctcagatgg taccanaaat atagacaatt gatccagaga g 51
 <210> 61
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C
 <400> 61
 gtcccagcta ctcacacagg aggatngcag gagtttgaaa ccagcctgtg c 51
 <210> 62
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C
 <400> 62
 caccctcagg gcctctccct gaccntctc tcacccccgg gacctccctg c 51
 <210> 63

<211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature

 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C
 <400> 63
 gcaggctgtgt gttccttggt atgttncctt gctacaggca ctctcagcct t 51
 <210> 64
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or A
 <400> 64
 gtcagtttgt gaacaggtaa aatcanaatg ctcatgttct ctacaggga a 51
 <210> 65
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 65
 agccaattcg tcagtgaatg aggcanagaa attggtaaaa agaaggaaag t 51

 <210> 66
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T or C

<400> 66
tacatagtag gcttaagagc aaatgnctac cttttcctct gttttcaact c 51
<210> 67
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T or G
<400> 67
gttggttggt ttgtttcccc tttaanggtg ccatttaatg acagatttca t 51
<210> 68
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = A or G
<400> 68
gccccggtga caagaatggc aaaacnttta ttcggcatta acaatgtgta a 51
<210> 69
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n = T or C
<400> 69
gtcagctaa tcaatgacca gtctcnttaa tttttctaata gcctatatgg t 51
<210> 70
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 70
 gtaagggatg tgaatcgggt actgangaaa gacctggat gcagagccag c 51

<210> 71
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or T
 <400> 71
 ttgataactt cagcatctgg atcacngtgg gattagcatc tgtttgtatt t 51

<210> 72
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or T
 <400> 72
 gtgtgattgc ttaaaaaaaaa ctactnecat tgttttgaat cacacctcac a 51

<210> 73
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 73
 acttggtcca ggctggcttt gcaacnatga gcctgagaag ctgttagaag t 51

<210> 74
 <211> 51

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A or G
 <400> 74
 gagacacaag aggtgggcag gtcttnggga tttaggagt gggttcaagg c 51
 <210> 75
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 75
 tgagtctgtg aggagaaatg aacaantcta ccacagtcac ccagaatgag a 51

 <210> 76
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C or T
 <400> 76
 atcagaaggc taaggaacca cctgtntaat agtctggtgc caaacacagg c 51
 <210> 77
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G or A
 <400> 77
 catcaataag aaaaacaaaa ataantntaat agaaaaatgc ataagagact t 51