

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 773**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2016 PCT/EP2016/081430**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17103108**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016 E 16822941 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3298040**

54 Título: **Tratamientos para la fibrosis**

30 Prioridad:

16.12.2015 GB 201522186

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.12.2018

73 Titular/es:

**SINGAPORE HEALTH SERVICES PTE LTD
(50.0%)**

**31 Third Hospital Avenue, No 03-03 Bowyer Block
Singapore 168753, SG y
NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COOK, STUART ALEXANDER y
SCHAEFER, SEBASTIAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 692 773 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamientos para la fibrosis

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al diagnóstico y al tratamiento de la fibrosis.

10 **Antecedentes de la invención**

10

La fibrosis es un proceso esencial y una parte crítica de la curación de heridas. La fibrosis excesiva es común en muchas patologías raras y comunes y es importante en la patogénesis de las enfermedades. Las enfermedades caracterizadas por una fibrosis excesiva incluyen, pero sin restricción: esclerosis sistémica, esclerodermia, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada (CMD), fibrilación auricular, fibrilación ventricular, miocarditis, cirrosis hepática, enfermedades renales, enfermedades de los ojos, asma, fibrosis quística, artritis y fibrosis pulmonar idiopática. A pesar de su gran impacto en la salud humana, las estrategias terapéuticas y diagnósticas para la fibrosis siguen siendo una necesidad médica no satisfecha.

15

20

El papel fisiológico real de la interleucina 11 (IL-11) sigue sin estar claro. IL-11 se ha vinculado de manera importante con la activación de células hematopoyéticas y con la producción de plaquetas, pero también se ha observado que es tanto pro como antiinflamatoria, proangiogénica e importante para las neoplasias. Se sabe que TGF β 1 o una lesión tisular pueden inducir la expresión de IL-11 (Zhu, M. et al. IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. PLOS ONE 10, (2015); Yashiro, R. et al. Transforming growth factor-beta stimulates interleukin-11 production by human periodontal ligament and gingival 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. y 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)).

25

30

De la bibliografía publicada no se desprende un papel claro para la IL-11 en la fibrosis. Se cree que IL-11 es importante para la fibrosis y la inflamación en el pulmón (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)) y su nivel de expresión está correlacionado con los niveles de colágeno en la piel (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)) y el sistema respiratorio (Molet, S., Hamid, Q. y 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)).

35

40

Sin embargo, la mayoría de estudios sugieren que la IL-11 es antifibrótica: en el corazón (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); documento US 2010/093976 A1) y el riñón (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)) y antiinflamatoria en varios tejidos y enfermedades inflamatorias crónicas (Trepicchio y Dorner. The therapeutic utility of Interleukin-11 in the treatment of inflammatory disease. (1998). doi:10.1517/13543784.7.9.1501). El modo de acción molecular de la IL-11 se cree que en general, es la regulación de la expresión de ARN de los niveles de ARNm mediante transcripción mediada por STAT3 (Zhu, M. et al. IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. PLOS ONE 10, (2015)).

45

50

55

El documento WO 98/36061 A2 divulga el uso de agentes que inhiben la actividad mediada por el receptor de IL-6 para el tratamiento de heridas y de la fibrosis. El documento WO 00/78336 A1 divulga métodos para tratar o inhibir la formación de fibrosis tisular usando antagonistas de IL-13.

Sumario de la invención

60

La presente invención proporciona un anticuerpo que es capaz de unirse a la interleucina 11 (IL-11) o al receptor α de IL-11 (IL-11R α) y de inhibir la señalización mediada por IL-11, para su uso en un método de tratamiento o prevención de la fibrosis en un ser humano, como se define en las reivindicaciones.

65

La presente invención se refiere al tratamiento, la prevención o el alivio de la fibrosis en un sujeto que necesite tratamiento mediante la administración de un agente capaz de inhibir la acción de la interleucina 11 (IL-11). Los inventores han identificado que IL-11 tiene una acción profibrótica. La presente divulgación se refiere, en particular, a

la inhibición de la acción profibrótica de la IL-11. Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a la inhibición o la prevención de la señal profibrótica mediada por IL-11, por ejemplo, mediada por la unión de IL-11 a un receptor de IL-11.

5 Los agentes divulgados en el presente documento capaces de inhibir la acción de la IL-11 pueden prevenir o reducir la unión de la IL-11 a un receptor de IL-11.

Los agentes divulgados en el presente documento capaces de inhibir la acción de la IL-11 pueden unirse a la IL-11 para formar un complejo que comprende el agente y la IL-11. El complejo puede ser un complejo covalente o no
10 covalente. En algunas realizaciones, la formación del complejo de agente:IL-11 puede prevenir o reducir la capacidad de la IL-11 para unirse a un receptor de IL-11. En algunas realizaciones, dicha prevención o reducción puede ser el resultado de una reducción de la unión productiva de la IL-11 a un receptor de IL-11, es decir, reducción de la capacidad de la IL-11 para iniciar la señalización mediada por el receptor de IL-11. En algunas realizaciones, la formación del complejo agente:IL-11 puede secuestrar a la IL-11 alejada del receptor de IL-11, impidiendo o
15 reduciendo de este modo el contacto de la IL-11 con un receptor de IL-11 y/o impidiendo o reduciendo la cantidad de IL-11 disponible para la unión a un receptor de IL-11. EN algunas realizaciones, el agente puede ser un receptor señuelo.

Los agentes divulgados en el presente documento capaces de inhibir la acción de la IL-11 pueden unirse a un
20 receptor de IL-11. Un agente que se une a un receptor de IL-11 puede prevenir o reducir la capacidad de la IL-11 para unirse a un receptor de IL-11 (IL-11R).

En el presente documento también se divulga el tratamiento, la prevención o el alivio de la fibrosis en un sujeto que
25 necesite tratamiento mediante la administración de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o de un receptor de IL-11 (IL-11R).

En el presente documento también se divulga un agente capaz de inhibir la acción de la interleucina 11 (IL-11) para su uso en un método de tratamiento o prevención de la fibrosis.

30 En el presente documento también se divulga el uso de un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento o prevención de la fibrosis.

En el presente documento también se divulga un método para tratar o prevenir la fibrosis, comprendiendo el método
35 administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11.

En algunas realizaciones, el agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 es un agente capaz de prevenir o reducir la unión de la IL-11 a un receptor de IL-11.

40 En algunas realizaciones, el agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 es un agente de unión a IL-11. Los agentes de unión a la IL-11 pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: un anticuerpo, polipéptido, péptido, oligonucleótido, aptámero o molécula pequeña. En algunas realizaciones, el agente de unión a la IL-11 es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente de unión a la IL-11 es un receptor señuelo.

45 En algunas realizaciones, el agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 es un agente de unión al receptor de IL-11 (IL-11R). Los agentes de unión a la IL-11R pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: un anticuerpo, polipéptido, péptido, oligonucleótido, aptámero o molécula pequeña. En algunas realizaciones, el agente de unión a la IL-11R es un anticuerpo.

50 En el presente documento también se divulga un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11 o del IL-11R para su uso en un método de tratamiento o prevención de la fibrosis.

En el presente documento también se divulga el uso de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-
55 11 o del IL-11R en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento o prevención de la fibrosis.

En el presente documento también se divulga un método para tratar o prevenir la fibrosis, comprendiendo el método
60 administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11 o del IL-11R.

En algunas realizaciones, el agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11 o del IL-11R es una
molécula pequeña o un oligonucleótido.

65 En algunas realizaciones, la fibrosis que se va a tratar o prevenir es fibrosis en el corazón, hígado o riñón. En algunas realizaciones, la fibrosis que se va a tratar o prevenir es fibrosis en los ojos. En algunas realizaciones, la fibrosis es en el corazón y se asocia con la disfunción de la musculatura o las propiedades eléctricas del corazón o

con el engrosamiento de las paredes o válvulas del corazón. En algunas realizaciones, la fibrosis es en el hígado y se asocia con la enfermedad hepática crónica o la cirrosis hepática. En algunas realizaciones, la fibrosis es en el riñón y se asocia con la enfermedad renal crónica.

5 En algunas realizaciones, el método de tratamiento o prevención comprende administrar dicho agente a un sujeto en el que la expresión de IL-11 o IL-11R está regulada positivamente. En algunas realizaciones, el método de
tratamiento o prevención comprende administrar dicho agente a un sujeto en el que se ha determinado que la
expresión de IL-11 o IL-11R está regulada positivamente. En algunas realizaciones, el método de tratamiento o
prevención comprende determinar si la expresión de la IL-11 o del IL-11R está regulada positivamente en el sujeto y
10 administrar dicho agente a un sujeto en el que la expresión de la IL-11 o del IL-11R está regulada positivamente.

En el presente documento también se divulga un método para determinar la idoneidad de un sujeto para el
tratamiento o la prevención de la fibrosis con un agente capaz de inhibir la acción de IL-11, comprendiendo el
método determinar, opcionalmente *in vitro*, si la expresión de la IL-11 o del IL-11R está regulada positivamente en el
15 sujeto.

En el presente documento también se divulga un método para seleccionar un sujeto para el tratamiento o la
prevención de la fibrosis con un agente capaz de inhibir la acción de IL-11, comprendiendo el método determinar,
opcionalmente *in vitro*, si la expresión de la IL-11 o del IL-11R está regulada positivamente en el sujeto.
20

En el presente documento también se divulga un método para diagnosticar la fibrosis o el riesgo de desarrollar
fibrosis en un sujeto, comprendiendo el método determinar, opcionalmente *in vitro*, la regulación positiva de la IL-11
o del IL-11R en una muestra obtenida del sujeto.

25 En algunas realizaciones, el método es un método para confirmar un diagnóstico de fibrosis en un sujeto que se
sospecha que tiene fibrosis.

En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar al sujeto para el tratamiento con un agente
capaz de inhibir la acción de la IL-11 o con un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11 o del IL-
30 11R.

En el presente documento también se divulga un método para proporcionar un pronóstico para un sujeto que tiene o
que se sospecha que tiene fibrosis, comprendiendo el método determinar, opcionalmente *in vitro*, si la IL-11 o el IL-
11R está regulado positivamente en una muestra obtenida del sujeto y, basándose en la determinación, proporcionar
35 un pronóstico para el tratamiento del sujeto con un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 o con un agente
capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11 o del IL-11R.

El método puede comprender además seleccionar a un sujeto que se ha determinado que tiene IL-11 o IL-11R
regulados positivamente para su tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 o con un agente
40 capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11 o del IL-11R.

En el presente documento también se divulga un método para diagnosticar la fibrosis o el riesgo de desarrollar
fibrosis en un sujeto, comprendiendo el método determinar, opcionalmente *in vitro*, uno o más factores genéticos en
el sujeto que predicen la regulación positiva de la expresión de la IL-11 o del IL-11R o de la regulación positiva de la
45 actividad de la IL-11 o del IL-11R.

En algunas realizaciones, el método es un método para confirmar un diagnóstico de fibrosis en un sujeto que se
sospecha que tiene fibrosis.

50 En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar al sujeto para el tratamiento con un agente
capaz de inhibir la acción de la IL-11 o con un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11 o del IL-
11R.

En el presente documento también se divulga un método para proporcionar un pronóstico para un sujeto que tiene o
que se sospecha que tiene fibrosis, comprendiendo el método determinar, opcionalmente *in vitro*, uno o más factores
genéticos en el sujeto que predicen la regulación positiva de la expresión de la IL-11 o del IL-11R o de la regulación
positiva de la actividad de la IL-11 o del IL-11R.
55

En el presente documento también se divulga un método para tratar la fibrosis en un sujeto humano, comprendiendo
el método administrar a un sujeto humano que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un
anticuerpo anti-interleucina 11 (IL-11), en donde el anticuerpo anti-IL-11 se une a la IL-11 e inhibe la señalización
mediada por IL-11.
60

En el presente documento también se divulga un método para tratar la fibrosis en un sujeto, comprendiendo el
65 método:

- (i) determinar, opcionalmente *in vitro*, si la expresión de la IL-11 o un receptor de interleucina 11 (IL-11R) está regulada positivamente en el sujeto; y
 (ii) administrar a un sujeto en el que está regulada positivamente la expresión de la IL-11 o del IL-11R una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-11, en donde el anticuerpo anti-IL-11 se une a la IL-11 e inhibe la señalización mediada por IL-11.

En el presente documento también se divulga un método para tratar la fibrosis en un sujeto, comprendiendo el método:

- (i) determinar, opcionalmente *in vitro*, uno o más factores genéticos en el sujeto que predicen la regulación positiva de la interleucina 11 (IL-11) o de la expresión o la actividad del receptor de interleucina 11 (IL-11R);
 (ii) seleccionar a un sujeto para su tratamiento basándose en la determinación de (i); y
 (ii) administrar al sujeto seleccionado una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-11, en donde el anticuerpo anti-IL-11 se une a la IL-11 e inhibe la señalización mediada por IL-11.

Descripción

IL-11 y receptor de IL-11

La interleucina 11 (IL-11), también conocida como factor inhibidor de la adipogénesis, es una citocina pleiotrópica y un miembro de la familia de citocinas de IL-6 que incluye IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, oncostatina, factor inhibidor de leucemia (LIF), cardiotrofina-1 (CT-1), citocina similar a cardiotrofina (CLC), factor neurotrófico ciliar (CNTF) y neuropoetina (NP-1).

La IL-11 se transcribe con un péptido de señal canónico que asegura una secreción eficaz por parte de las células. La forma inmadura de la IL-11 humana es un polipéptido de 199 aminoácidos, mientras que la forma madura de la IL-11 codifica una proteína de 178 restos de aminoácido (Garbers y Scheller., Biol. Chem. 2013; 394(9): 1145-1161). La secuencia de aminoácidos de IL-11 humana se encuentra disponible con el n.º de referencia de UniProt P20809 (P20809.1 GI:124294). También se encuentra disponible comercialmente IL-11 humana recombinante (oprelvekin). También se ha clonado y secuenciado IL-11 de otras especies, incluyendo de ratón, rata, cerdo, vaca, diversas especies de peces óseos y primates.

En la presente memoria descriptiva, IL-11 se refiere a una IL-11 de cualquier especie e incluye isoformas, fragmentos, variantes u homólogos de una IL-11 de cualquier especie. En realizaciones preferidas, la especie es humana (*Homo sapiens*). Las isoformas, fragmentos, variantes u homólogos de una IL-11 pueden caracterizarse opcionalmente por tener al menos un 70 %, preferentemente uno de un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de la secuencia de aminoácidos de IL-11 inmadura o madura de una especie dada, por ejemplo, humana. Las isoformas, fragmentos, variantes u homólogos de una IL-11 pueden caracterizarse opcionalmente por su capacidad para unirse a IL-11R α (preferentemente de la misma especie) y estimulan la transducción de señales en células que expresan IL-11R α y gp130 (por ejemplo, como se describe en Curtis et al. Blood, 1997, 90(11); o Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80). Un fragmento de IL-11 puede ser de cualquier longitud (por número de aminoácidos), aunque opcionalmente puede tener al menos un 25 % de la longitud de IL-11 madura y puede tener una longitud máxima de uno del 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la longitud de la IL-11 madura. Un fragmento de IL-11 puede tener una longitud mínima de 10 aminoácidos y una longitud máxima de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 195 aminoácidos.

La IL-11 señala a través de un homodímero de glucoproteína 130 de receptor β expresado de manera ubicua (gp130; también conocida como glucoproteína 130, IL6ST, IL6-beta o CD130). Gp130 es una proteína transmembrana que forma una subunidad del receptor de citocinas de tipo I con la familia de receptor de IL-6. La especificidad se logra mediante un receptor individual de IL-11 α (IL-11R α), que no participa directamente en la transducción de señales, aunque el evento de unión de citocinas inicial al α receptor da lugar a la formación final del complejo con los β receptores. La IL-11 activa una vía de señalización aguas abajo, que es predominantemente la cascada de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y la vía de Janus cinasa/transductor y activador de la transcripción (Jak/STAT) (Garbers y Scheller, anteriormente citado).

La gp130 humana (incluyendo el péptido de señal de 22 aminoácidos) es una proteína de 918 aminoácidos y la forma madura tiene 866 aminoácidos, que comprende un dominio extracelular de 597 aminoácidos, un dominio transmembrana de 22 aminoácidos y un dominio intracelular de 277 aminoácidos. El dominio extracelular de la proteína comprende el módulo de unión a citocinas (CBM) de gp130. El CBM de gp130 comprende el dominio D1 similar a Ig y los dominios D2 y D3 de fibronectina de tipo III de gp130. La secuencia de aminoácidos de gp130 humana se encuentra disponible con el n.º de referencia de GenBank NP_002175.2.

IL-11R α humano es un polipéptido de 422 aminoácidos (n.º de referencia de GenBank NP_001136256.1 GI:218505839) y comparte ~85 % de identidad de secuencia de nucleótidos y aminoácidos respecto del IL-11R α murino (Du y Williams., Blood Vol, 89, n.º 11, 1 de junio de 1997). Se ha informado de dos isoformas de IL-11R α ,

que difieren en el dominio citoplasmático (Du y Williams, anteriormente citado). La cadena α del receptor de IL-11 (IL-11R α) comparte diversas similitudes estructurales y funcionales con la cadena α del receptor de IL-6 (IL-6R α). El dominio extracelular muestra una identidad de aminoácidos del 24 %, incluyendo el motivo conservado característico Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). El dominio citoplasmático corto (34 aminoácidos) carece de las regiones de caja 1 y 2 que son necesarias para la activación de la vía de señalización de JAK/STAT.

IL-11R α se une a su ligando con baja afinidad ($K_D \sim 10$ nmol/l) y solo es insuficiente para transducir una señal biológica. La generación de un receptor de alta afinidad ($K_D \sim 400$ a 800 pmol/l) capaz de transducir señales requiere de la expresión conjunta del IL-11R α y de gp130 (Curtis et al. Blood, 1 de diciembre de 1997;90 (11):4403-12; Hilton et al., EMBO J 13:4765, 1994; Nandurkar et al., Oncogene 12:585, 1996). La unión de IL-11 a IL-11R α en la superficie celular induce la heterodimerización, la fosforilación de tirosina, la activación de gp130 y MAPK y/o la señalización de Jak/STAT como se ha descrito anteriormente.

Se han mapeado los sitios de unión a receptor en IL-11 murina y se han identificado tres sitios, los sitios I, II y III. La unión a gp130 se reduce mediante sustituciones en la región del sitio II y mediante sustituciones en la región del sitio III. Los mutantes del sitio III no muestran actividad agonista detectable y tienen actividad antagonista de IL-11R α (Cytokine Inhibitors, Capítulo 8; editado por Gennaro Ciliberto y Rocco Savino, Marcel Dekker, Inc. 2001).

En principio, un IL-11R α soluble también puede formar complejos solubles biológicamente activos con IL-11 (Pflanz et al., 1999 FEBS Lett, 450, 117-122) lo que induce a pensar que, de manera similar a la IL-6, la IL-11 puede unirse en algunos casos a IL-11R α soluble antes de unirse a gp130 soluble de la superficie celular (Garbers y Scheller, anteriormente citado). Curtis et al (Blood, 1 de diciembre de 1997;90 (11):4403-12) describen la expresión de una cadena alfa de receptor de IL-11 murina (sIL-11R) y examinaron su señalización en células que expresan gp130. En presencia de gp130 pero no de IL-11R transmembrana, se produce la diferenciación de células leucémicas M1 dependiente de IL-11 mediada por sIL-11R y la proliferación en células Ba/F3 y los eventos intracelulares tempranos, incluyendo la fosforilación de gp130, STAT3 y SHP2 de manera similar a la señalización a través de IL-11R transmembrana.

En la presente memoria descriptiva, un receptor de IL-11 (IL-11R) se refiere a un polipéptido capaz de unirse a IL-11 y de inducir la transducción de señales en células que expresan gp130. Un receptor de IL-11 puede ser de cualquier especie e incluye isoformas, fragmentos, variantes u homólogos de un receptor de IL-11 de cualquier especie. En realizaciones preferidas, la especie es humana (*Homo sapiens*). En algunas realizaciones, el receptor de IL-11 puede ser IL-11R α . Las isoformas, fragmentos, variantes u homólogos de una IL-11R α pueden caracterizarse opcionalmente por tener al menos un 70 %, preferentemente uno de un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de la secuencia de aminoácidos de IL-11R α de una especie dada, por ejemplo, humana. Las isoformas, fragmentos, variantes u homólogos de una IL-11R α pueden caracterizarse opcionalmente por su capacidad para unirse a IL-11 (preferentemente de la misma especie) y estimulan la transducción de señales en células que expresan el IL-11R α y gp130 (por ejemplo, como se describe en Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) o Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80). Un fragmento de un receptor de IL-11 puede ser de cualquier longitud (por número de aminoácidos), aunque opcionalmente puede tener al menos un 25 % de la longitud del IL-11R α maduro y tiene una longitud máxima de uno del 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la longitud del IL-11R α maduro. Un fragmento de un receptor de IL-11 puede tener una longitud mínima de 10 aminoácidos y una longitud máxima de uno de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400 o 415 aminoácidos.

Agente capaz de inhibir la acción de IL-11

La vía de señalización de IL-11 ofrece múltiples rutas para la inhibición de la señalización de IL-11. Por ejemplo, la inhibición puede lograrse impidiendo o reduciendo la unión de IL-11 a un receptor de IL-11. Como resultado, los agentes adecuados pueden actuar de manera selectiva sobre IL-11 o su receptor.

En algunas realizaciones, los agentes capaces de inhibir la acción de IL-11 pueden unirse a IL-11 e impedir o reducir la señalización mediada por IL-11, por ejemplo, a través de un receptor de IL-11. En algunas realizaciones, los agentes capaces de inhibir la acción de IL-11 pueden unirse al receptor de IL-11 e impedir o reducir la señalización estimulada por IL-11.

Los agentes que se unen a IL-11 pueden inhibir la señalización mediada por IL-11 bloqueando la unión de IL-11 a un receptor de IL-11 y/o reduciendo la cantidad de IL-11 disponible para unirse a su receptor. Los agentes de unión a IL-11 adecuados pueden ser inhibidores de IL-11 o antagonistas de IL-11.

Los agentes de unión a IL-11, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-11, de acuerdo con la presente divulgación pueden mostrar al menos una de las siguientes propiedades:

- a) Unión a IL-11 humana con una K_D de 1 μ M o menor, preferentemente uno de ≤ 1 μ M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM o ≤ 100 pM;

5 b) Inhibir la señalización mediada por IL-11 a través del receptor IL-11R α , por ejemplo, en un ensayo basado en células en el que las células expresan conjuntamente IL-11R α y gp130. Los ensayos basados en células adecuados son incorporación de ^3H -timidina y ensayos de proliferación celular de Ba/F3 descritos, por ejemplo, en Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) y Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80. Por ejemplo, puede determinarse la CI_{50} para un agente de unión a IL-11 cultivando células Ba/F3 que expresan IL-11R α y gp130 en presencia de IL-11 humana y el agente de unión a IL-11 y midiendo la incorporación de ^3H -timidina en el ADN. Los agentes de unión a IL-11 adecuados pueden mostrar una CI_{50} de 10 $\mu\text{g/ml}$ o menor, preferentemente, uno de $\leq 5 \mu\text{g/ml}$, $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, $\leq 3,5 \mu\text{g/ml}$, $\leq 3 \mu\text{g/ml}$, $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0,9 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0,8 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0,7 \mu\text{g/ml}$, $\leq 0,6 \mu\text{g/ml}$ o $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ en dicho ensayo.

10 c) Inhibir la proliferación de fibroblastos, por ejemplo, la proliferación de fibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimula a fibroblastos con IL-11 o TGF β 1 y se monitoriza la proliferación celular, como se describe en el presente documento.

15 d) Inhibir la generación de miofibroblastos, por ejemplo, causada por fibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimula a fibroblastos con IL-11 o TGF β 1 y se monitoriza la proliferación de miofibroblastos, por ejemplo, midiendo los niveles de αSMA .

20 e) Inhibir la producción de matriz extracelular por los fibroblastos, por ejemplo, fibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimula a fibroblastos con IL-11 o TGF β 1 y se mide la producción de componentes de la matriz extracelular.

25 f) Inhibir la expresión génica o de proteína de colágeno y/o periostina en los fibroblastos, por ejemplo, fibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimula a fibroblastos con IL-11 o TGF β 1 y se mide la expresión génica o de proteína de colágeno y/o periostina.

Los agentes de unión a IL-11 pueden ser de cualquier tipo, pero en algunas realizaciones, un agente de unión a IL-11 puede ser un anticuerpo, polipéptido, péptido, oligonucleótido, aptámero o molécula pequeña.

30 Los anticuerpos anti-IL-11 adecuados se unirán preferentemente a IL-11 (el antígeno), preferentemente IL-11 humana y pueden tener una constante de disociación (K_D) de uno de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 100\text{pM}$. La afinidad de unión de un anticuerpo por su diana normalmente se describe en términos de su constante de disociación (K_D). La afinidad de unión puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, tal como mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) o mediante un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA) llevado a cabo con la versión Fab del anticuerpo y la molécula de antígeno.

35 Los anticuerpos anti-IL-11 pueden ser anticuerpos antagonistas que inhiben o reducen una actividad biológica de IL-11.

40 Los anticuerpos anti-IL-11 pueden ser anticuerpos neutralizantes que neutralizan el efecto biológico de IL-11, por ejemplo, su capacidad para estimular la señalización productiva mediante un receptor de IL-11.

45 La actividad neutralizante puede medirse por la capacidad para neutralizar la proliferación inducida por IL-11 en la línea celular de plasmacitoma de ratón T11 (Nordan, R. P. *et al.* (1987) J. Immunol. 139:813).

50 Algunos ejemplos de anticuerpos anti-IL-11 conocidos incluyen el anticuerpo monoclonal, clon 6D9A, clon KT8 (Abbotec), clon M3103F11 (BioLegend), clon 1F1, clon 3C6 (Abnova Corporation), clon GF1 (LifeSpan Biosciences), clon 13455 (Source BioScience) y clon 22626 (R & D Systems, usado en Bockhorn et al. Nat. Commun. (2013) 4(0):1393; IgG $_{2A}$ monoclonal de ratón; n.º de catálogo MAB218; R&D Systems, MN, EE. UU.).

Opcionalmente, pueden seleccionarse los anticuerpos para que prácticamente no muestren reactividad cruzada con uno o más de IL-6, CNTF, LIF, OSM, CLC o CT-1 humano, por ejemplo, humano recombinante.

55 Los agentes de unión a IL-11 a base de péptidos o polipéptidos pueden estar basados en el receptor de IL-11, por ejemplo, un fragmento de unión a IL-11 de un receptor de IL-11. En una realización, los agentes de unión a IL-11 adecuados pueden comprender un fragmento de unión a IL-11 de la cadena IL-11R α y pueden ser preferentemente solubles y/o excluir uno o más o todos los dominios transmembrana. Dichas moléculas pueden describirse como receptores señuelo.

60 Curtis et al (Blood, 1 de diciembre de 1997;90 (11):4403-12) informaron de que la cadena alfa del receptor de IL-11 murino (sIL-11R) era capaz de antagonizar la actividad de IL-11 cuando se prueba en células que expresan IL-11R transmembrana y gp130. Propusieron que el antagonismo de IL-11 observado por el sIL-11R depende del número limitante de moléculas de gp130 en las células que ya expresan el IL-11R transmembrana.

65 También se ha comunicado el uso de receptores señuelo solubles como base para la inhibición de la transducción de señales y de intervención terapéutica para otros pares de molécula de señalización:receptor, por ejemplo, VEGF

y el receptor de VEGF (De-Chao Yu et al., *Molecular Therapy* (2012); 20 5, 938-947; Konner y Dupont *Clin Colorectal Cancer*, octubre de 2004;4 Supl 2:S81-5).

5 Como tal, en algunas realizaciones, puede proporcionarse un agente de unión a IL-11 en forma de un receptor señuelo, por ejemplo, un receptor de IL-11 soluble. Se ha comunicado que la competición por IL-11 proporcionada por un receptor señuelo da lugar a una acción antagonista de IL-11 (Curtis et al., anteriormente citado).

10 Los receptores señuelo de IL-11 se unen preferentemente a IL-11 y/o a complejos que contienen IL-11 y de este modo, hacen que estas especies no estén disponibles para unirse a receptores de gp130, IL-11R α y/o gp130:IL-11R α . Como tal, actúan como receptores "señuelo" para IL-11 y complejos que contienen IL-11, prácticamente del mismo modo en que actúa etanercept como receptor señuelo para TNF α . La señalización mediada por IL-11 se reduce en comparación con el nivel de señalización en ausencia del receptor señuelo.

15 Los receptores señuelo de IL-11 se unen preferentemente a IL-11 por medio de uno o más módulos de unión a citocinas (CBM). Las CBM son o proceden o son homólogas a las CBM de moléculas de receptor de origen natural para IL-11. Por ejemplo, los receptores señuelo de IL-11 pueden comprender o consistir en una o más CBM que son de, proceden de o son homólogas a la CBM de gp130 y/o IL-11R α .

20 En algunas realizaciones, un receptor señuelo de IL-11 puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos correspondiente al módulo de unión a citocinas de gp130. En algunas realizaciones, un receptor señuelo de IL-11 puede comprender una secuencia de aminoácidos correspondiente al módulo de unión a citocinas de IL-11R α . En el presente documento, una secuencia de aminoácidos que "corresponde" a una región o secuencia de referencia de un péptido/polipéptido dado tiene al menos un 60 %, por ejemplo, uno de al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos de la región/secuencia de referencia. La gp130, el IL-11R α y la IL-11 pueden ser de cualquier especie e incluyen isoformas, fragmentos, variantes u homólogos de cualquier especie.

30 En algunas realizaciones, un receptor señuelo puede ser capaz de unirse a IL-11, por ejemplo, con una afinidad de al menos 100 μ M o menor, opcionalmente, una de 10 μ M o menor, 1 μ M o menor, 100nM o menor o de aproximadamente 1 a 100nM. En algunas realizaciones, un receptor señuelo puede comprender la totalidad o parte del dominio de unión de IL-11 y puede carecer opcionalmente de la totalidad o parte de los dominios transmembrana. El receptor señuelo puede estar opcionalmente fusionado a una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, una región Fc de IgG.

35 En algunas realizaciones, puede proporcionarse un agente de unión a IL-11 en forma de un inhibidor de molécula pequeña de IL-11, por ejemplo, el inhibidor de IL-11 descrito en Lay et al., *Int. J. Oncol.* (2012); 41(2): 759-764.

40 Los agentes que se unen a un receptor de IL-11 (IL-11R) pueden inhibir la señalización mediada por IL-11 bloqueando la unión de IL-11 a un IL-11R o impidiendo la transducción de señales mediante los co-receptores de gp130. Los agentes de unión a IL-11R adecuados pueden ser inhibidores de IL-11R o antagonistas de IL-11R. En realizaciones preferidas, el IL-11R es IL-11R α y los agentes de unión adecuados pueden unirse al polipéptido de IL-11R α y pueden ser inhibidores o antagonistas del IL-11R α .

45 Los agentes de unión a IL-11R, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-11R, de acuerdo con la presente divulgación pueden mostrar al menos una de las siguientes propiedades:

- (a) Unión a IL-11R humana con una K_D de 1 μ M o menor, preferentemente uno de $\leq 1 \mu$ M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM o ≤ 100 pM;
- 50 (b) Inhibir la señalización de IL-11R, por ejemplo, en un ensayo basado en células en el que las células expresan conjuntamente IL-11R α y gp130. Los ensayos basados en células adecuados son incorporación de 3 H-timidina y ensayos de proliferación celular de Ba/F3 descritos, por ejemplo, en Curtis et al. *Blood*, 1997, 90(11) y Karpovich et al. *Mol. Hum. Reprod.* 2003 9(2): 75-80. Por ejemplo, puede determinarse la CI_{50} para un agente de unión a IL-11R cultivando células Ba/F3 que expresan IL-11R α y gp130 en presencia de IL-11 humana y el agente de unión a IL-11R y midiendo la incorporación de 3 H-timidina en el ADN. Los agentes de unión a IL-11R adecuados pueden mostrar una CI_{50} de 10 μ g/ml o menor, preferentemente, uno de $\leq 5 \mu$ g/ml, $\leq 4 \mu$ g/ml, $\leq 3,5 \mu$ g/ml, $\leq 3 \mu$ g/ml, $\leq 2 \mu$ g/ml, $\leq 1 \mu$ g/ml, $\leq 0,9 \mu$ g/ml, $\leq 0,8 \mu$ g/ml, $\leq 0,7 \mu$ g/ml, $\leq 0,6 \mu$ g/ml o $\leq 0,5 \mu$ g/ml en dicho ensayo.
- 55 (c) Inhibir la proliferación de fibroblastos, por ejemplo, la proliferación de fibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimula a fibroblastos con IL-11 o TGF β 1 y se monitoriza la proliferación celular, como se describe en el presente documento.
- 60 (d) Inhibir la generación de miofibroblastos, por ejemplo, causada por fibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimula a fibroblastos con IL-11 o TGF β 1 y se monitoriza la proliferación de miofibroblastos, por ejemplo, midiendo los niveles de α SMA.
- (e) Inhibir la producción de matriz extracelular por los fibroblastos, por ejemplo, fibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimula a fibroblastos con IL-11 o TGF β 1 y se mide la producción de componentes de la matriz extracelular.
- 65 (f) Inhibir la expresión génica o de proteína de colágeno y/o periostina en los fibroblastos, por ejemplo,

fibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimula a fibroblastos con IL-11 o TGFβ1 y se mide la expresión génica o de proteína de colágeno y/o periostina.

5 Los agentes de unión a IL-11R pueden ser de cualquier tipo, pero en algunas realizaciones, un agente de unión a IL-11R puede ser un anticuerpo, polipéptido, péptido, oligonucleótido, aptámero o molécula pequeña.

10 Los anticuerpos anti-IL-11R adecuados se unirán preferentemente a IL-11R (el antígeno), preferentemente IL-11R humana y pueden tener una constante de disociación (K_D) de uno de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$ o $\leq 100\text{pM}$. La afinidad de unión de un anticuerpo por su diana normalmente se describe en términos de su constante de disociación (K_D). La afinidad de unión puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, tal como mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) o mediante un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA) llevado a cabo con la versión Fab del anticuerpo y la molécula de antígeno.

15 Los anticuerpos anti-IL-11R pueden ser anticuerpos antagonistas que inhiben o reducen una actividad biológica de IL-11R. Los anticuerpos anti-IL-11R pueden ser anticuerpos antagonistas que inhiben o reducen cualquier función de IL-11R, en particular, la señalización. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas de IL-11R pueden inhibir o impedir la unión de IL-11 a IL-11R o pueden inhibir o prevenir la asociación de IL-11Rα con gp130 para formar un complejo de receptor funcional capaz de señalizar de manera productiva, por ejemplo, en respuesta a la unión de IL-11.

20 Los anticuerpos anti-IL-11R pueden ser anticuerpos neutralizantes que neutralizan el efecto biológico de IL-11R, por ejemplo, su capacidad para iniciar la señalización productiva mediada por la unión de IL-11.

25 La actividad neutralizante puede medirse por la capacidad para neutralizar la proliferación inducida por IL-11 en la línea celular de plasmacitoma de ratón T11 (Nordan, R. P. *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:813).

30 Algunos ejemplos de anticuerpos anti-IL-11R conocidos incluyen el anticuerpo monoclonal, clon 025 (Sino Biological), clon EPR5446 (Abcam), clon 473143 (R & D Systems), los clones 8E2 y 8E4 descritos en el documento US 2014/0219919 A1 y los anticuerpos monoclonales descritos en Blanc *et al.* (*J. Immunol Methods.* 31 de julio de 2000;241(1-2);43-59).

35 Los agentes de unión a IL-11R a base de péptidos o polipéptidos pueden estar basados en IL-11, por ejemplo, un mutante, variante o fragmento de unión a IL-11. Los agentes a base de péptidos o polipéptidos adecuados pueden unirse a IL-11R de un modo que no da lugar al inicio de la transducción de señales o produce una señalización subóptima. Los mutantes de IL-11 de este tipo pueden actuar como inhibidores competitivos de la IL-11 endógena.

40 Por ejemplo, W147A es un antagonista de IL-11 en el que el aminoácido 147 se muta de un triptófano a una alanina, que destruye el denominado "sitio III" de la IL-11. Este mutante puede unirse al IL-11R, pero fracasa el acoplamiento del homodímero de gp130, dando como resultado un bloqueo eficaz de la señalización de IL-11 (Underhill-Day *et al.*, 2003; *Endocrinology*, agosto de 2003;144(8):3406-14). Lee *et al.* (*Am J Respir Cell Mol Biol.* diciembre de 2008; 39(6):739-746) también comunican la generación de un mutante antagonista de IL-11 (una "muteína") capaz de inhibir de manera específica la unión de IL-11 a IL-11Rα.

45 Menkhorst *et al.* (*Biology of Reproduction* 1 de mayo de 2009 vol.80 n.º 5 920-927) describen un antagonista de IL-11 PEGilado, PEGIL11A (CSL Limited, Parkville, Victoria, Australia) que es eficaz para inhibir la acción de la IL-11 en ratones hembra.

Pasqualini *et al.* *Cancer* (2015) 121(14):2411 -2421 describen un fármaco peptidomimético dirigido contra un ligando, el peptidomimético-11 que actúa de manera selectiva en metástasis óseas (BMTP-11) capaz de unirse a IL-11Rα.

50 En algunas realizaciones, puede proporcionarse un agente de unión a IL-11R en forma de un inhibidor de molécula pequeña de IL-11R.

55 Los inventores han identificado que la regulación positiva de la expresión de IL-11 es consistente con el mecanismo molecular de la fibrosis y que la inhibición de la actividad de la IL-11 da lugar a una reducción en la base molecular de la fibrosis. Por consiguiente, en algunos aspectos de la presente divulgación, el tratamiento, la prevención o el alivio de la fibrosis puede proporcionarse mediante la administración de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 por células del sujeto, por ejemplo, por fibroblastos o miofibroblastos.

60 Los agentes adecuados pueden ser de cualquier tipo, pero en algunas realizaciones, un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 puede ser una molécula pequeña o un oligonucleótido.

Taki *et al.* (*Clin Exp Immunol.* abril de 1998; 112(1): 133-138) comunican una reducción en la expresión de IL-11 en células sinoviales reumatoides tras el tratamiento con indometacina, dexametasona o interferón gamma (IFNγ).

65 En algunas realizaciones, un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 puede ser un oligonucleótido capaz de reprimir o silenciar la expresión de la IL-11.

Por consiguiente, la presente divulgación también incluye el uso de técnicas conocidas en la materia para la regulación negativa terapéutica de la expresión de IL-11. Estas incluyen el uso de oligonucleótidos antisentido y de interferencia de ARN (iARN). Como en otros aspectos de la presente divulgación, estas técnicas pueden usarse en el tratamiento de la fibrosis.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir la fibrosis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11, en donde el agente comprende un vector que comprende un oligonucleótido terapéutico capaz de reprimir o silenciar la expresión de IL-11.

10 En el presente documento también se divulga un método para tratar o prevenir la fibrosis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11, en donde el agente comprende un vector oligonucleotídico, opcionalmente, un vector vírico, que codifica un oligonucleótido terapéutico capaz de expresarse en células del sujeto, siendo capaz el oligonucleótido terapéutico expresado de reprimir o silenciar la expresión de IL-11.

15 Puede evaluarse la capacidad de un agente para prevenir o reducir la expresión de IL-11 determinando la capacidad del agente para inhibir la expresión génica o de proteína de IL-11 por fibroblastos o miofibroblastos, por ejemplo, fibroblastos o miofibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimulan fibroblastos o miofibroblastos con IL-11 o TGFβ1 y se mide la expresión génica o de proteína de IL-11.

20 La reducción de la cantidad de IL-11R disponible para la unión a IL-11 y el inicio de una señalización productiva proporciona un medio alternativo para reducir el nivel de señalización estimulada por IL-11. Por consiguiente, en aspectos relacionados divulgados en el presente documento, el tratamiento, la prevención o el alivio de la fibrosis puede proporcionarse mediante la administración de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11R por células del sujeto, por ejemplo, por fibroblastos o miofibroblastos.

25 En algunas realizaciones, un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11R puede ser un oligonucleótido capaz de reprimir o silenciar la expresión de la IL-11R.

30 Por consiguiente, la presente divulgación también incluye el uso de técnicas conocidas en la materia para la regulación negativa terapéutica de la expresión de IL-11R. Estas incluyen el uso de oligonucleótidos antisentido y de interferencia de ARN (iARN). Como en otros aspectos de la presente divulgación, estas técnicas pueden usarse en el tratamiento de la fibrosis.

35 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la fibrosis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11R, en donde el agente comprende un vector que comprende un oligonucleótido terapéutico capaz de reprimir o silenciar la expresión de IL-11R.

40 La presente divulgación también proporciona un método para tratar o prevenir la fibrosis, comprendiendo el método administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11R, en donde el agente comprende un vector oligonucleotídico, opcionalmente, un vector vírico, que codifica un oligonucleótido terapéutico capaz de expresarse en células del sujeto, siendo capaz el oligonucleótido terapéutico expresado de reprimir o silenciar la expresión de IL-11R.

45 Puede evaluarse la capacidad de un agente para prevenir o reducir la expresión de IL-11R determinando la capacidad del agente para inhibir la expresión génica o de proteína de IL-11R por fibroblastos o miofibroblastos, por ejemplo, fibroblastos o miofibroblastos cardíacos/auriculares. Por ejemplo, esto puede evaluarse en un ensayo en donde se estimulan fibroblastos o miofibroblastos con IL-11 o TGFβ1 y se mide la expresión génica o de proteína de IL-11R.

50 En realizaciones preferidas, el IL-11R puede ser IL-11Rα.

55 Anticuerpos

En la presente memoria descriptiva, "anticuerpo" incluye un fragmento o derivado de un anticuerpo o un anticuerpo sintético o un fragmento de anticuerpo sintético.

60 Los anticuerpos pueden proporcionarse en forma aislada o purificada. Los anticuerpos pueden formularse en forma de una composición farmacéutica o un medicamento.

65 En vista de las técnicas actuales en relación con la tecnología de anticuerpos monoclonales, pueden prepararse anticuerpos para la mayoría de antígenos. La parte de unión a antígeno puede ser una parte de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab) o un fragmento de anticuerpo sintético (por ejemplo, un fragmento Fv monocatenario [scFv]). Pueden prepararse anticuerpos monoclonales adecuados para antígenos seleccionados mediante técnicas

conocidas, por ejemplo, las divulgadas en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982). Los anticuerpos quiméricos se describen por Neuberger et al. (1988, 8th International Biotechnology Symposium, Parte 2, 792-799).

5 Los anticuerpos monoclonales (mAb) son útiles en los métodos de la invención y son una población homogénea de anticuerpos que se dirigen específicamente a un solo epítipo en un antígeno.

10 Los anticuerpos policlonales son útiles en los métodos de la invención. Se prefieren anticuerpos monoclonales mono-específicos. Pueden prepararse anticuerpos policlonales adecuados usando métodos bien conocidos en la técnica.

15 Los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos, tales como fragmentos Fab y Fab₂ también pueden usarse/proporcionarse, al igual que anticuerpos diseñados por ingeniería genética y fragmentos de anticuerpo. Los dominios variable pesado (V_H) y variable ligero (V_L) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento del antígeno, un hecho reconocido inicialmente por los primeros experimentos de digestión con proteasas. Esto se pudo confirmar adicionalmente mediante la "humanización" de anticuerpos de roedor. Los dominios variables originarios de roedor pueden fusionarse a dominios constantes de origen humano, de tal forma que el anticuerpo resultante conserva la especificidad antigénica del anticuerpo progenitor de roedor (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

25 Se sabe que la especificidad antigénica se confiere por medio de los dominios variables y que es independiente de los dominios constantes, según se extrae de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpo, conteniendo todos uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas de tipo Fab (Better et al.(1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); moléculas de Fv monocatenario (scFv) donde los dominios compañeros V_H y V_L están unidos mediante un oligopéptido flexible (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) y anticuerpos de un solo dominio (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Puede encontrarse una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpo que conservan sus sitios de unión específicos en Winter y Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

30 Por "moléculas de scFv" se entiende moléculas en donde los dominios compañeros V_H y V_L están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un oligopéptido flexible.

35 Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, scFv y dAb pueden expresarse y secretarse en *E. coli*, permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

40 Los anticuerpos completos y los fragmentos F(ab')₂ son "bivalentes". Por "bivalente" se entiende que dichos anticuerpos y fragmentos F(ab')₂ tienen dos sitios de combinación con el antígeno. Por el contrario, los fragmentos Fab, Fv, scFv y dAb son monovalentes, al tener solo un sitio de combinación con el antígeno. También pueden prepararse anticuerpos sintéticos que se unen a IL-11 o a IL-11R usando la tecnología de presentación en fagos, como se conoce bien en la técnica.

45 Los anticuerpos pueden producirse mediante un proceso de maduración por afinidad en el que se genera un anticuerpo modificado que tiene una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental no modificado. Los anticuerpos madurados por afinidad se pueden producir mediante procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, Marks *et al.*, *Bio/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); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

50 Los anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación muestran preferentemente unión a IL-11 o a IL-11R. Un anticuerpo que se une específicamente a una molécula diana se une preferentemente a la diana con mayor afinidad y/o con una mayor duración que la unión a otras dianas. En una realización, el alcance de la unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es menor de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la diana, medida, por ejemplo, mediante ELISA o mediante un radioinmunoensayo (RIA). Como alternativa, la especificidad de unión puede reflejarse en términos de afinidad de unión, donde el anticuerpo se une a IL-11 o a IL-11R con una K_D que es al menos de 0,1 orden de magnitud (es decir, 0,1 x 10ⁿ, donde n es un número entero que representa el orden de magnitud) mayor que la K_D del anticuerpo frente a otra molécula diana, por ejemplo, otro miembro de la familia de IL-11, tal como IL-6 o el receptor de IL-6. Esta puede ser opcionalmente de al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 o 2,0.

65 Los anticuerpos pueden estar marcados de manera detectable o al menos, ser detectables. Dichos anticuerpos son útiles para aplicaciones tanto in vivo (por ejemplo, métodos de obtención de imágenes) como in vitro (por ejemplo, métodos de ensayo). Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un átomo radiactivo o una molécula coloreada o una molécula fluorescente o una molécula que pueda detectarse fácilmente por otros medios. Las moléculas

detectables adecuadas incluyen proteínas fluorescentes, luciferasa, sustratos enzimáticos y radiomarcadores. El resto de unión puede marcarse directamente con un marcador detectable o puede marcarse de manera indirecta. Por ejemplo, el resto de unión puede ser un anticuerpo no marcado que puede detectarse mediante otro anticuerpo que en este caso está marcado. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede tener unida biotina y se usa la unión de estreptavidina marcada a la biotina para marcar de manera indirecta el primer anticuerpo.

Los aspectos de la presente divulgación incluyen anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, formados por dos fragmentos diferentes de dos anticuerpos diferentes, de tal forma que el anticuerpo biespecífico se une a dos tipos de antígeno. Uno de los antígenos es IL-11 o IL-11R, comprendiendo el anticuerpo biespecífico un fragmento como se describe en el presente documento que se une a IL-11 o IL-11R. El anticuerpo puede contener un fragmento diferente que tiene afinidad por un segundo antígeno, que puede ser cualquier antígeno deseado. En la técnica son bien conocidos los métodos para la preparación de anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, véase 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).

En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se proporciona en forma de una proteína de fusión de dos fragmentos variables monocatenarios (scFv), que comprenden una V_H y V_L de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a IL-11 o IL-11R y una V_H y V_L de otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos biespecíficos y los fragmentos de unión a antígeno biespecíficos pueden proporcionarse en cualquier formato adecuado, tales como los formatos descritos en Kontermann *MAbs* 2012, 4(2): 182-197. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno biespecífico puede ser un conjugado de anticuerpo biespecífico (por ejemplo, una IgG₂, F(ab')₂ o CovX-Body), una molécula de IgG o similar a IgG biespecífica (por ejemplo, una IgG, scFv₄-Ig, IgG-scFv, scFv-IgG, DVD-Ig, IgG-sVD, sVD-IgG, 2 en 1-IgG, mAb² o LC común de Tandemab), una molécula de IgG o similar a IgG biespecífica asimétrica (por ejemplo, una IgG kih, LC común de IgG kih, CrossMab, IgG kih-scFab, mAb-Fv, par de carga o SEED-body), una molécula de anticuerpo biespecífica pequeña (por ejemplo, un Diabody (Db), dsDb, DART, scDb, tandAbs, scFv en tándem (taFv), dAb/VHH en tándem, triple cuerpo, triple cabeza, Fab-scFv o F(ab')₂-scFv₂), un Fc biespecífico y una proteína de fusión C_H3 (por ejemplo, un taFv-Fc, Di-diabody, scDb-C_H3, scFv-Fc-scFv, HCAb-VHH, scFv-kih-Fc o scFv-kih-C_H3) o una proteína de fusión biespecífica (por ejemplo, una scFv₂-albúmina, scDb-albúmina, taFv-toxina, DNL-Fab₃, DNL-Fab₄-IgG, DNL-Fab₄-IgG-citocina₂). Véase, en particular, la figura 2 de Kontermann *MAbs* 2012, 4(2): 182-19.

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos incluyen la reticulación química de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, con enlaces disulfuro reducibles o tioéter no reducibles, por ejemplo, como se describe en Segal y Bast, 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1 - 2.13.16. Por ejemplo, puede usarse N-succinimidil-3-(2-piridil)tió-propionato (SPDP) para reticular químicamente, por ejemplo, fragmentos Fab a través de los grupos SH de la región bisagra, para crear heterodímeros de F(ab)₂ biespecíficos unidos por disulfuro.

Otros métodos para producir anticuerpos biespecíficos incluyen fusionar hibridomas productores de anticuerpos, por ejemplo, con polietilenglicol, para producir una célula de cuádrima capaz de secretar un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, como se describe en D. M. y Bast, B. J. 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1 - 2.13.16.

Los anticuerpos biespecíficos y los fragmentos de unión a antígeno biespecíficos también pueden producirse de manera recombinante, mediante expresión, por ejemplo, a partir de una construcción de ácido nucleico que codifica polipéptidos para las moléculas de unión a antígeno, por ejemplo, como se describe en *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Segunda edición (Humana Press, 2012), en el capítulo 40: Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv (Hornig y Farber-Schwarz) o French, How to make bispecific antibodies, *Methods Mol. Med.* 2000; 40:333-339.

Por ejemplo, puede prepararse mediante técnicas de clonación molecular una construcción de ADN que codifica los dominios variables de cadena ligera y pesada para los dos dominios de unión a antígeno (es decir, los dominios variables de cadena ligera y pesada para el dominio de unión a antígeno capaz de unirse a IL-11 o IL-11R y los dominios variables de cadena ligera y pesada para el dominio de unión a antígeno capaz de unirse a otra proteína diana) y que incluye secuencias que codifican un enlazador o dominio de dimerización adecuado entre los dominios de unión a antígeno. Posteriormente, puede producirse un anticuerpo biespecífico recombinante mediante expresión (por ejemplo, *in vitro*) de la construcción en una célula hospedadora adecuada (por ejemplo, una célula hospedadora de mamífero) y opcionalmente, puede purificarse el anticuerpo biespecífico recombinante expresado.

Aptámeros

Los aptámeros, también denominados ligandos de ácido nucleico, son moléculas de ácido nucleico caracterizadas por su capacidad para unirse a una molécula diana con alta especificidad y alta afinidad. Hasta la fecha, prácticamente todos los aptámeros identificados son moléculas de origen no natural.

5 Pueden identificarse aptámeros para una diana dada (por ejemplo, IL-11 o IL-11R) y/o producirse mediante el método de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX™, por sus siglas en inglés, *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*). Los aptámeros y SELEX se describen en Tuerk y Gold (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science. 3 de agosto de 1990;249(4968):505-10) y en el documento WO91/19813.

10 Los aptámeros pueden ser moléculas de ADN o ARN y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. El aptámero puede comprender ácidos nucleicos modificados químicamente, por ejemplo, en los que el azúcar y/o el fosfato y/o la base se ha modificado químicamente. Dichas modificaciones pueden mejorar la estabilidad del aptámero o hacer que el aptámero sea más resistente a la degradación y pueden incluir una modificación en la posición 2' de la ribosa.

Los aptámeros pueden sintetizarse mediante métodos que se conocen bien por una persona experta. Por ejemplo, los aptámeros pueden modificarse químicamente, por ejemplo, sobre un soporte sólido.

15 La síntesis en fase sólida puede usar química de fosforamidita. Brevemente, se deshidrata un nucleótido sobre un soporte sólido, después se acopla a un nucleósido de fosforamidita activado de manera adecuada para formar un enlace fosfito triéster. Después, puede producirse el taponamiento, seguido de la oxidación del fosfito triéster con un oxidante, normalmente yodo. Después, puede repetirse el ciclo para montar el aptámero.

20 Los aptámeros pueden considerarse como el equivalente en ácido nucleico a los anticuerpos monoclonales y normalmente tienen K_D en el intervalo nM o pM, por ejemplo, menos de uno de 500nM, 100nM, 50nM, 10nM, 1nM, 500pM, 100pM. Al igual que con los anticuerpos monoclonales, pueden ser útiles en prácticamente cualquier situación en la que se necesite unión a la diana, incluyendo su uso en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, *in vitro* o *in vivo*. Las aplicaciones diagnósticas *in vitro* pueden incluir el uso para detectar la presencia o ausencia de una molécula diana.

30 Los aptámeros de acuerdo con la presente divulgación pueden proporcionarse en una forma purificada o aislada. Los aptámeros de acuerdo con la presente divulgación pueden formularse en forma de una composición farmacéutica o de un medicamento.

Los aptámeros adecuados pueden tener opcionalmente una longitud mínima de uno de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos.

35 Los aptámeros adecuados pueden tener opcionalmente una longitud máxima de uno de 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 u 80 nucleótidos.

40 Los aptámeros adecuados pueden tener opcionalmente una longitud de uno de 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 u 80 nucleótidos.

Represión mediante oligonucleótidos de la expresión de IL-11 o IL-11R

45 Las moléculas de oligonucleótido, en particular ARN, pueden emplearse para regular la expresión génica. Estas incluyen oligonucleótidos antisentido, degradación dirigida de ARNm mediante ARN pequeños de interferencia (ARNpi), silenciamiento génico postraducciona (PTG), represión traduccional específica de secuencia regulada por el desarrollo del ARNm mediante micro-ARN (miARN) y silenciamiento génico transcripcional dirigido.

50 Un oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido, preferentemente monocatenario, que actúa de manera selectiva y se une, mediante unión de secuencia complementaria, a un oligonucleótido diana, por ejemplo, ARNm. En caso de que el oligonucleótido diana sea un ARNm, la unión del antisentido al ARNm bloquea la traducción del ARNm y la expresión del producto génico. Los oligonucleótidos antisentido pueden diseñarse para que se unan a un ácido nucleico genómico codificante e inhibir la transcripción de una secuencia de nucleótidos diana.

55 En vista de las secuencias de ácido nucleico conocidas para IL-11 (por ejemplo, las secuencias de ARNm conocidas disponibles de GenBank® con los números de referencia: BC012506.1 GI:15341754 (humano), BC134354.1 GI:126632002 (ratón), AF347935.1 GI:13549072 (rata)) e IL-11R (por ejemplo, las secuencias de ARNm conocidas disponibles en GenBank® con los números de referencia: NM_001142784.2 GI:391353394 (humano), NM_001163401.1 GI:254281268 (ratón), NM_139116.1 GI:20806172 (rata)), pueden diseñarse oligonucleótidos para reprimir o silenciar la expresión de IL-11 o IL-11R. Dichos oligonucleótidos pueden tener cualquier longitud, pero preferentemente, serán cortos, por ejemplo, de menos de 100 nucleótidos, por ejemplo, de 10-40 nucleótidos o de 20-50 nucleótidos y pueden comprender una secuencia de nucleótidos que sea total o parcialmente complementaria (por ejemplo, un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de complementariedad) respecto de una secuencia de nucleótidos con una longitud correspondiente en el oligonucleótido diana, por ejemplo, el ARNm de IL-11 o IL-11R. La región complementaria de la secuencia de

nucleótidos puede tener cualquier longitud, pero preferentemente, tiene al menos 5 y opcionalmente no más de 50 nucleótidos de longitud, por ejemplo, uno de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos.

- 5 La represión de la expresión de IL-11 o IL-11R dará preferentemente como resultado una reducción en la cantidad de IL-11 o IL-11R expresados por una célula, por ejemplo, por un fibroblasto o miofibroblasto. Por ejemplo, en una célula dada, la represión de IL-11 o IL-11R mediante la administración de un ácido nucleico diana dará como resultado una reducción en la cantidad de IL-11 o IL-11R expresado por esa célula en relación con una célula no tratada. La represión puede ser parcial. Los grados de represión preferidos son de al menos un 50 %, más preferentemente, uno de al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 85 % o 90 %. Se considera que un nivel de represión entre el 90 % y el 100 % es un "silenciamiento" de la expresión o función.

15 Se ha demostrado el papel de la maquinaria de iARN y de los ARN pequeños para actuar de manera selectiva sobre complejos de heterocromatina y en el silenciamiento génico epigenético en loci cromosómicos específicos. El silenciamiento postranscripcional dependiente de ARN bicatenario (ARNbc), también conocido como interferencia de ARN (iARN), es un fenómeno por el cual los complejos de ARNbc pueden actuar de manera selectiva sobre genes específicos de homología para silenciarlos durante un corto espacio de tiempo. Actúa como señal para promover la degradación del ARNm con identidad de secuencia. En general, un ARNpi de 20 nt tiene una longitud suficiente para inducir el silenciamiento específico de genes, pero es lo suficientemente corto para evadir a la respuesta por el hospedador. La reducción en la expresión de los productos génicos diana puede ser extensa, induciéndose un silenciamiento del 90 % por unas pocas moléculas de ARNpi. Los agentes terapéuticos basados en la iARN han avanzado hasta ensayos clínicos de fase I, II y III para una serie de indicaciones (Nature, 22 de enero de 2009; 457(7228):426-433).

25 En la técnica, estas secuencias de ARN se denominan "ARN cortos o pequeños de interferencia" (ARNpi) o "microARN" (miARN) dependiendo de su origen. Pueden usarse los dos tipos de secuencia para regular negativamente la expresión génica mediante la unión a ARN complementarios y desencadenando la eliminación del ARNm (iARN) o deteniendo la traducción del ARNm en proteína. El ARNpi se obtiene procesando ARN bicatenarios largos y cuando se encuentra en la naturaleza, normalmente es de origen exógeno. Los micro-ARN de interferencia (miARN) son ARN no codificantes pequeños codificados de manera endógena, obtenidos mediante el procesado de horquillas cortas. Tanto el ARNpi como el miARN pueden inhibir la traducción de los ARNm que portan secuencias diana parcialmente complementarias sin escisión de ARN y degradan los ARNm que portan secuencias completamente complementarias.

35 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona el uso de secuencias de oligonucleótidos para regular negativamente la expresión de IL-11 o IL-11R.

40 Los ligandos de ARNpi normalmente son bicatenarios y, para optimizar la eficacia de la regulación negativa mediada por ARN de la función de un gen diana, se prefiere que la longitud de la molécula de ARNpi se seleccione a fin de asegurar el reconocimiento correcto del ARNpi por el complejo RISC que media el reconocimiento mediante el ARNpi del ARNm diana y de tal forma que el ARNpi es lo suficientemente corto como para reducir una respuesta del hospedador.

45 Los ligandos de miARN normalmente son monocatenarios y tienen regiones que son parcialmente complementarias, lo que permite que los ligandos formen una horquilla. Los miARN son genes d ARN que se transcriben a partir del ADN, pero no se traducen en proteínas. Una secuencia de ADN que codifica un gen de miARN es más larga que el miARN. Esta secuencia de ADN incluye la secuencia de miARN y un complemento inverso aproximado. Cuando esta secuencia de ADN se transcribe en una molécula de ARN monocatenario, la secuencia de miARN y su complemento inverso se emparejan para formar un segmento de ARN parcialmente bicatenario. El diseño de secuencias de microARN se describe en John et al, PLoS Biology, 11 (2), 1862-1879, 2004.

50 Por lo general, los ligandos de ARN pensados para imitar los efectos del ARNpi o del miARN tienen entre 10 y 40 ribonucleótidos (o análogos sintéticos de los mismos), más preferentemente, entre 17 y 30 ribonucleótidos, más preferentemente, entre 19 y 25 ribonucleótidos y lo más preferentemente, entre 21 y 23 ribonucleótidos. En algunas realizaciones de la divulgación que emplean ARNpi bicatenario, la molécula puede tener salientes 3' simétricos, por ejemplo, de uno o dos (ribo)ribonucleótidos, normalmente un saliente de UU o dTdT 3'. Basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, el experto en la materia puede diseñar fácilmente secuencias de ARNpi y miARN adecuadas, por ejemplo, usando recursos tales como el buscador de ARNpi de Ambion. Las secuencias de ARNpi y miARN pueden producirse de manera sintética y añadirse de manera exógena para provocar la regulación génica negativa o producirse usando sistemas de expresión (por ejemplo, vectores). En una realización preferida, el ARNpi se sintetiza de manera sintética.

65 Los ARN bicatenarios más largos pueden procesarse en la célula para producir ARNpi (véase, por ejemplo, Myers (2003) Nature Biotechnology 21:324-328). La molécula de ARNbc más larga puede tener salientes 3' o 5' simétricos, por ejemplo, uno o dos (ribo)ribonucleótidos o puede tener extremos romos. Las moléculas de ARNbc más largas pueden tener 25 nucleótidos o más. Preferentemente, las moléculas de ARNbc más largas tienen entre 25 y 30

nucleótidos de longitud. Más preferentemente, las moléculas de ARNbc más largas tienen entre 25 y 27 nucleótidos de longitud. Lo más preferentemente, las moléculas de ARNbc más largas tienen 27 nucleótidos de longitud. Los ARNbc de 30 nucleótidos o más de longitud pueden expresarse usando el vector pDECAP (Shinagawa et al., Genes and Dev., 17, 1340-5, 2003).

5 Otra alternativa es la expresión de una molécula de ARN en horquilla corta (ARNhc) en la célula. Los ARNhc son más estables que los ARNpi sintéticos. Un ARNhc consta de dos repeticiones invertidas separadas por una secuencia de bucle pequeña. Una repetición invertida es complementaria a la diana génica. En la célula, el ARNhc se procesa mediante DICER en un ARNpi que degrada el ARNm del gen diana y suprime la expresión. En una
10 realización preferida, el ARNhc se produce de manera endógena (dentro de una célula) mediante transcripción a partir de un vector. Los ARNhc pueden producirse dentro de una célula transfectando la célula con un vector que codifica la secuencia de ARNhc bajo el control de un promotor de ARN polimerasa UIII, tal como el promotor H1 o 7SK o un promotor de ARN polimerasa II. Como alternativa, el ARNhc puede sintetizarse de manera exógena (*in vitro*) mediante transcripción a partir de un vector. Después, puede introducirse el ARNhc directamente en la célula.
15 Preferentemente, la molécula de ARNhc comprende una secuencia parcial de IL-11 o IL-11R. Preferentemente, la secuencia de ARNhc tiene entre 40 y 100 bases de longitud, más preferentemente, entre 40 y 70 bases de longitud. El tallo de la horquilla tiene preferentemente entre 19 y 30 pares de bases de longitud. El tallo puede contener emparejamientos de G-U para estabilizar la estructura de la horquilla.

20 Las moléculas de ARNpi, más largas que las moléculas de ARNbc o miARN, pueden producirse de manera recombinante mediante transcripción de una secuencia de ácido nucleico, contenida, preferentemente, en un vector. Preferentemente, la molécula de ARNpi, más larga que la molécula de ARNbc o la molécula de miARN, comprende una secuencia parcial de IL-11 o IL-11R.

25 En una realización, el ARNpi, más largo que el ARNbc o el miARN, se produce de manera endógena (dentro de una célula) mediante transcripción a partir de un vector. El vector puede introducirse en la célula en por cualquiera de los modos conocidos en la técnica. Opcionalmente, puede regularse la expresión de la molécula de ARN usando un promotor específico de tejido (por ejemplo, específico para el corazón, el hígado, el riñón o los ojos). En una realización adicional, el ARNpi, más largo que el ARNbc o el miARN, se produce de manera exógena (*in vitro*)
30 mediante transcripción a partir de un vector.

Los vectores adecuados pueden ser vectores oligonucleotídicos configurados para expresar el agente de nucleótidos capaz de reprimir la IL-11 o el IL-11R. Dichos vectores pueden ser vectores víricos o vectores plasmídicos. El oligonucleótido terapéutico puede incorporarse en el genoma de un vector vírico y unirse operativamente a una
35 secuencia reguladora, por ejemplo, un promotor, que dirige su expresión. La expresión "unido operativamente" puede incluir la situación donde se unen covalentemente una secuencia de nucleótido seleccionada y una secuencia de nucleótido reguladora, de tal forma que se coloca la expresión de una secuencia de nucleótidos bajo la influencia o el control de la secuencia reguladora. Por lo tanto, se une operativamente una secuencia reguladora a una secuencia de nucleótidos seleccionada en caso de que la secuencia reguladora sea capaz de efectuar la
40 transcripción de una secuencia de nucleótidos que forma parte o supone la totalidad de la secuencia de nucleótidos seleccionada.

Los vectores víricos que codifican secuencias de ARNpi expresadas por promotor se conocen en la técnica y tienen el beneficio de expresión a largo plazo del oligonucleótido terapéutico. Los ejemplos incluyen lentivirus (Nature 22,
45 de enero de 2009; 457(7228):426-433), adenovirus (Shen et al., FEBS Lett 27 de marzo de 2003;539(1-3)111-4) y retrovirus (Barton y Medzhitov PNAS 12 de noviembre de 2002, vol.99, n.º 23 14943-14945).

En otras realizaciones, puede configurarse un vector para ayudar en el suministro del oligonucleótido terapéutico al sitio en el que se necesita la represión de la expresión de IL-11 o IL-11R. Dichos vectores implican normalmente
50 complejar el oligonucleótido con un vector cargado positivamente (por ejemplo, péptidos catiónicos que penetran en células, polímeros catiónicos y dendrímeros y lípidos catiónicos); conjugación del oligonucleótido con moléculas pequeñas (por ejemplo, colesterol, ácidos biliares y lípidos), polímeros, anticuerpos y ARN; o encapsular el oligonucleótido en formulaciones en nanopartículas (Wang et al., AAPS J. diciembre de 2010; 12(4): 492-503).

55 En una realización, un vector puede comprender una secuencia de ácido nucleico en orientación tanto con sentido como antisentido, de tal forma que cuando se expresan como ARN, las secciones sentido y antisentido se asociarán para formar un ARN bicatenario.

Como alternativa, pueden sintetizarse moléculas de ARNpi usando técnicas de síntesis convencionales en fase
60 sólida o de solución que se conocen en la técnica. Los enlaces entre nucleótidos pueden ser enlaces fosfodiéster o alternativas, por ejemplo, grupos de enlace de fórmula P(O)S, (tioato); P(S)S, (ditioato); P(O)NR'2; P(O)R'; P(O)OR6; CO; o CONR'2, en donde R es H (o una sal) o alquilo (C1-12) y R6 es alquilo (C1-9) unido a nucleótidos adyacentes a través de -O- o -S-.

65 Pueden usarse bases de nucleótidos modificadas además de las bases de origen natural y pueden conferir propiedades ventajosas a las moléculas de ARNpi que las contienen.

Por ejemplo, las bases modificadas pueden aumentar la estabilidad de la molécula de ARNpi, reduciendo de este modo la cantidad necesaria para el silenciamiento. El hecho de proporcionar bases modificadas también puede proporcionar moléculas de ARNpi que son más estables o menos que el ARNpi no modificado.

5 La expresión "base nucleotídica modificada" abarca nucleótidos con una base modificada covalentemente y/o un azúcar. Por ejemplo, los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos que tienen azúcares que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 3' y distintos de un grupo fosfato en la posición 5'. Los nucleótidos modificados de este modo también pueden incluir azúcares 2' sustituidos, tales como 2'-O-metilo-; 2'-O-alquilo; 2'-O-alilo; 2'-S-alquilo; 2'-S-alilo; 2'-fluoro-; 2'-halo o
10 azido-ribose, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anoméricos; azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa y sedoheptulosa.

Se conocen en la técnica nucleótidos modificados e incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas y pirimidinas aciladas y otros heterociclos. Se conocen en la técnica estas clases de pirimidinas y purinas e incluyen
15 seudoisocitosina, N4,N4-etanocitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometil uracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopentil-adenina, 1-metiladenina, 1-metilseudouracilo, 1-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometil uracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, D-manosilqueosina, 5-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-
20 metiltio-N6-isopentiladenina, metil éster del ácido uracil-5-oxiacético, seudouracilo, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracilo 5-oxiacético, queosina, 2-tiocitosina, 5-propiluracilo, 5-propilcitosina, 5-etiluracilo, 5-etilcitosina, 5-butiluracilo, 5-pentiluracilo, 5-pentilcitosina y 2,6-diaminopurina, metilseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilcitosina.

25 Los métodos relativos al uso de iARN para silenciar genes en *C. elegans*, *Drosophila*, plantas y mamíferos se conocen en la técnica (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
30 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M., et al., Genes Dev. 15, 188-200 (2001); documentos WO0129058; WO9932619, y Elbashir S M, et al., 2001 Nature 411:494-498).

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico que es capaz, cuando se introduce de manera adecuada o se expresa en una célula de mamífero, por ejemplo humana que por lo demás expresa IL-11 o
35 IL-11R, de suprimir la expresión de IL-11 o IL-11R mediante iARN.

El ácido nucleico puede tener una identidad de secuencia sustancial respecto de una parte del ARNm de IL-11 o IL-11R, como se define en el n.º de referencia de GenBank NM_000641.3 GI:391353405 (IL-11) o U32324.1 GI:975336 (IL-11R) o la secuencia complementaria de dicho ARNm.

40 El ácido nucleico puede ser un ARNpi bicatenario. (Tal como apreciará un experto en la materia y como se explica en más detalle más adelante, una molécula de ARNpi también puede incluir una secuencia de ADN corta 3').

Como alternativa, el ácido nucleico puede ser un ADN (normalmente ADN bicatenario) que, cuando se transcribe en una célula de mamífero, proporciona un ARN que tiene dos porciones complementarias unidas mediante un espaciador, de tal forma que el ARN adopta la forma de una horquilla cuando las porciones complementarias hibridan entre sí. En una célula de mamífero, puede escindirse de la molécula la estructura en horquilla mediante la encima DICER, para proporcionar dos moléculas de ARN distintas pero hibridadas.

50 En algunas realizaciones preferidas, el ácido nucleico se dirige generalmente a la secuencia de una de las SEQ ID NO: 2 a 5 (IL-11; figura 11) o a una de las SEQ ID NO: 7 a 10 (IL-11R; figura 12).

Se espera que únicamente las regiones monocatenarias (es decir, no auto-hibridadas) de un transcrito de ARNm sean dianas adecuadas para la iARN. Por lo tanto, se propone que también pueden ser dianas útiles para la iARN
55 otras secuencias del transcrito de ARNm de IL-11 o IL-11R muy próximas a la secuencia representada por una de las SEQ ID NO: 2 a 5 o 7 a 10. Dichas secuencias tienen preferentemente 17-23 nucleótidos de longitud y preferentemente, se solapan con una de las SEQ ID NO: 2 a 5 o 7 a 10 en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o los 19 nucleótidos (en cualquiera de los extremos de una de las SEQ ID NO: 2 a 5 o 7 a 10).

60 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico que es capaz, cuando se introduce de manera adecuada o se expresa en una célula de mamífero que por lo demás expresa IL-11 o IL-11R, de suprimir la expresión de IL-11 o IL-11R mediante iARN, en donde el ácido nucleico se dirige generalmente a la secuencia de una de las SEQ ID NO: 2 a 5 o 7 a 10.

65

Por "dirigido de manera general" se entiende que el ácido nucleico puede actuar de manera selectiva sobre una secuencia que se solapa con las SEQ ID NO: 2 a 5 o 7 a 10. En particular, el ácido nucleico puede actuar de manera selectiva sobre una secuencia en el ARNm de IL-11 o IL-11R humano que es ligeramente más larga o más corta que la de las SEQ ID NO: 2 a 5 o 7 a 10 (preferentemente, de 17-23 nucleótidos de longitud), pero por lo demás, es idéntica a una de las SEQ ID NO: 2 a 5 o 7 a 10.

Aunque sea preferible, no se espera que sea esencial una identidad/complementariedad perfecta entre el ácido nucleico y la secuencia diana. Por consiguiente, el ácido nucleico puede incluir un solo desemparejamiento en comparación con el ARNm de IL-11 o IL-11R. Sin embargo, se espera que la presencia de incluso un solo desemparejamiento ocasione una reducción en la eficacia, por lo que se prefiere la ausencia de desemparejamientos. Cuando están presentes, los salientes 3' pueden excluirse de la consideración del número de desemparejamientos.

El término "complementariedad" no se limita al emparejamiento de bases convencional entre ácidos nucleicos que consisten en ribo y/o desoxirribonucleótidos de origen natural, sino que también incluye emparejamiento de bases entre ARNm y ácidos nucleicos que incluyen nucleótidos no naturales.

En una realización, el ácido nucleico (citado en el presente documento como ARNpi bicatenario) incluye las secuencias de ARN bicatenarias mostradas en la figura 13 (IL-11; SEQ ID NO: 11 a 14).

En otra realización, el ácido nucleico (citado en el presente documento como ARNpi bicatenario) incluye las secuencias de ARN bicatenarias mostradas en la figura 14 (IL-11R; SEQ ID NO: 15 a 18).

Sin embargo, también se espera que sean eficaces secuencias ligeramente más cortas o más largas dirigidas a la misma región de ARNm de IL-11 o IL-11R. En particular, se espera que también sean eficaces secuencias bicatenarias de entre 17 y 23 pb de longitud.

Las hebras que forman el ARN bicatenario pueden tener salientes de dinucleótidos cortos 3', que pueden ser de ADN o ARN. El uso de un saliente de ADN 3' no tiene efecto en la actividad del ARNpi en comparación con un saliente de ARN 3', pero reduce el coste de la síntesis química de las hebras de ácido nucleico (Elbashir et al., 2001c). Por este motivo, pueden preferirse dinucleótidos de ADN.

Cuando están presentes, los salientes de dinucleótidos pueden ser simétricos entre sí, aunque esto no es esencial. De hecho, el saliente 3' de la hebra con sentido (superior) es irrelevante para la actividad de iARN, ya que no participa en el reconocimiento y la degradación del ARNm (Elbashir et al., 2001a, 2001b, 2001c).

Aunque los experimentos de iARN en *Drosophila* demuestran que los salientes 3' antisentido pueden participar en el reconocimiento y la acción selectiva sobre el ARNm (Elbashir et al. 2001c), no parece que los salientes 3' sean necesarios para la actividad de iARN del ARNpi en las células de mamífero. Por lo tanto, se cree que una hibridación incorrecta de los salientes 3' tendrá poco efecto en las células de mamífero (Elbashir et al. 2001c; Czauderna et al. 2003).

Por lo tanto, puede usarse cualquier saliente de dinucleótidos en la hebra antisentido del ARNpi. No obstante, el dinucleótido es, preferentemente, -UU o -UG (o -TT o -TG en caso de que el saliente sea de ADN), más preferentemente -UU (o -TT). El saliente de dinucleótido -UU (o -TT) es más eficaz y es consistente (es decir, capaz de formar parte de) la señal de final de la transcripción de la ARN polimerasa III (la señal de terminación es TTTTT). Por consiguiente, se prefiere especialmente este dinucleótido. También pueden usarse los dinucleótidos AA, CC y GG, pero son menos eficaces y por consiguiente, menos preferidos.

Además, pueden omitirse por completo los salientes 3' del ARNpi.

La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos monocatenarios (citados en el presente documento como ARNpi monocatenarios) que consisten, respectivamente, en una hebra componente de uno de los ácidos nucleicos bicatenarios anteriormente mencionados, preferentemente con los salientes 3', pero opcionalmente sin ellos. La presente divulgación también proporciona kits que contienen pares de dichos ácidos nucleicos monocatenarios, que son capaces de hibridar entre sí *in vitro* para formar los ARNpi bicatenarios anteriormente mencionados, que después pueden introducirse en células.

La presente divulgación también proporciona ADN que, cuando se transcribe en una célula de mamífero, proporciona un ARN (también citado en el presente documento como ARNhc) que tiene dos porciones complementarias que son capaces de auto-hibridar para producir un motivo bicatenario, que incluye, por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11 a 14 o 15 a 18 o una secuencia que difiere respecto de una cualquiera de las secuencias anteriormente mencionadas por una sustitución de un solo par de bases.

Las porciones complementarias normalmente estarán unidas por un espaciador, que tiene una longitud y secuencia adecuadas para permitir que hibriden entre sí las dos porciones complementarias. Las dos porciones complementarias (es decir, sentido y antisentido) pueden unirse en 5'-3' en cualquier orden. El espaciador será normalmente una secuencia corta, de aproximadamente 4-12 nucleótidos, preferentemente, de 4-9 nucleótidos, más preferentemente, de 6-9 nucleótidos.

Preferentemente, el extremo 5' del espaciador (inmediatamente 3' de la porción complementaria cadena arriba) consiste en los nucleótidos -UU- o -UG-, de nuevo preferentemente -UU- (aunque, de nuevo, no es esencial el uso de estos dinucleótidos particulares). Un espaciador adecuado, recomendado para su uso en el sistema pSuper de OligoEngine (Seattle, Washington, EE. UU.) es UUCAAGAGA. En este y otros casos, los extremos del espaciador pueden hibridar entre sí, por ejemplo, alargando el motivo bicatenario más allá de las secuencias exactas de las SEQ ID NO: 11 a 14 o 15 a 18 en un pequeño número (por ejemplo, 1 o 2) de pares de bases.

De manera similar, el ARN transcrito incluye preferentemente un saliente 3' desde la porción complementaria aguas abajo. De nuevo, este es preferentemente -UU o -UG, más preferentemente -UU.

Dichas moléculas de ARNhc pueden escindir-se posteriormente en la célula de mamífero por la enzima DICER para proporcionar un ARNpi bicatenario como se ha descrito anteriormente, en el que una o cada una de las hebras del ARNbc hibridado incluye un saliente 3'.

Las técnicas para la síntesis de los ácidos nucleicos de la presente divulgación, obviamente, son bien conocidas en la técnica.

El experto en la materia será capaz de construir vectores de transcripción adecuados para el ADN de la presente divulgación usando técnicas bien conocidas y materiales disponibles comercialmente. En particular, el ADN se asociará con secuencias de control, que incluyen un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Son particularmente útiles los sistemas pSuper y pSuperior de OligoEngine (Seattle, Washington, EE. UU.). Estos usan un promotor de polimerasa III (H1) y una secuencia terminadora de la transcripción T₅ que aporta dos restos de U en el extremo 3' del transcrito (que, tras su procesamiento por DICER, proporciona un saliente de UU 3' de una hebra del ARNpi).

Se describe otro sistema adecuado en Shin et al. (RNA, mayo de 2009; 15(5): 898-910), que usa otro promotor de polimerasa III (U₆).

Los ARNpi bicatenarios de la presente divulgación pueden introducirse en células de mamífero *in vitro* o *in vivo* usando técnicas conocidas, tal como se describe más adelante, para suprimir la expresión de IL-11 o IL-11R.

De manera similar, pueden introducirse vectores de transcripción que contienen los ADN de la presente divulgación en células tumorales *in vitro* o *in vivo* usando técnicas conocidas, tal como se describe más adelante, para la expresión transitoria o estable del ARN, nuevamente, para suprimir la expresión de IL-11 o IL-11R.

Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona un método para suprimir la expresión de IL-11 o IL-11R en una célula de mamífero, por ejemplo, humana, comprendiendo el método administrar a la célula un ARNpi bicatenario de la invención o un vector de transcripción de la invención.

De manera similar, la presente divulgación proporciona además un método para tratar la fibrosis, comprendiendo el método administrar a un sujeto un ARNpi bicatenario o un vector de transcripción divulgado en el presente documento.

La presente divulgación proporciona además los ARNpi bicatenarios y los vectores de transcripción divulgados en el presente documento, para su uso en un método de tratamiento, preferentemente, un método para tratar la fibrosis.

La presente divulgación proporciona además el uso de los ARNpi bicatenarios y de los vectores de transcripción divulgados en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis.

Además, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un ARNpi bicatenario o un vector de transcripción divulgado en el presente documento mezclado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen vehículos o vesículas lipófilas, que pueden ayudar a penetrar la membrana celular.

Los materiales y métodos adecuados para la administración de dúplex de ARNpi y vectores de ADN de la presente divulgación se conocen bien en la técnica y se encuentran en desarrollo métodos mejorados, dado el potencial de la tecnología de iARN.

En general, se encuentran disponibles diversas técnicas para introducir ácidos nucleicos en células de mamífero. La elección de la técnica dependerá de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células de un paciente. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano y precipitación con fosfato de calcio. Las técnicas de transferencia génica *in vivo* incluyen transfección con vectores víricos (normalmente retrovíricos) y transfección mediada por proteínas de la envuelta vírica-liposomas (Dzau et al. (2003) Trends in Biotechnology 11, 205-210).

En particular, las técnicas adecuadas para la administración célula de los ácidos nucleicos de la presente divulgación, tanto *in vitro* como *in vivo* se divulgan en los siguientes artículos:

Revisiones generales: 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. y P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet. 3:737-47. Scherr, M., M.A. Morgan y 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 y T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. Drug Discov Today. 7:1040-6.

Systemic delivery using liposomes: Lewis, D.L., J.E. Hagstrom, A.G. Loomis, J.A. Wolff y 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 y 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 y J. Lieberman. 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med. 9:347-51. Sorensen, D.R., M. Leirdal y M. Sioud. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. J Mol Biol. 327:761-6.

Virus mediated transfer: Abbas-Terki, T., W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralong y P. Aebischer. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. Hum Gene Ther. 13:2197-201. Barton, G.M. y R. Medzhitov. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. Proc Natl Acad Sci USA. 99:14943-5. Devroe, E. y P.A. Silver. 2002. Retrovirus-delivered siRNA. BMC Biotechnol. 2:15. Lori, F., P. Gullini, L. Galluzzi y J. Lisiewicz. 2002. Gene therapy approaches to HIV infection. Am J Pharmacogenomics. 2:245-52. Matta, H., B. Hozayev, R. Tomar, P. Chugh y 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 y D. Baltimore. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. Proc Natl Acad Sci USA. 100:183-8. Scherr, M., K. Battmer, A. Ganser y 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 y S.N. Reske. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. FEBS Lett. 539:111-4.

Peptide delivery: Morris, M.C., L. Chaloin, F. Heitz y 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 y 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. Otras tecnologías que pueden ser adecuadas para el suministro de ARNpi a las células diana están basadas en nanopartículas o nanocápsulas, tales como las descritas en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.649.192B y 5.843.509B.

45 Formulaciones

En aplicaciones terapéuticas, los agentes capaces de inhibir la acción de la IL-11 o los agentes capaces de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R se formulan preferentemente en forma de medicamento o agente farmacéutico, junto con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables diferentes bien conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensoactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascarantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas farmacéuticas, etc., que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, un ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcionado con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, adyuvante, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Los vehículos, adyuvantes, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994.

Las formulaciones se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el principio activo con vehículos (por ejemplo, vehículos líquidos, vehículo sólido finamente dividido, etc.) y luego dando forma al producto, si fuese necesario.

Las formulaciones pueden prepararse para las vías de administración tópica, parenteral, sistémica, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal, intraocular, intra-conjuntiva, subcutánea, oral o transdérmica, que pueden incluir inyección. Las formulaciones inyectables pueden comprender el agente seleccionado en un medio estéril o isotónico.

La administración es preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", que es suficiente para mostrar un beneficio al individuo. La cantidad real administrada y la velocidad y el ciclo de tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la posología, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos de familia y otros facultativos y normalmente se tiene en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden hallar en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

Fibrosis

Tal como se usa en el presente documento, "fibrosis" se refiere a la formación de un exceso de tejido conectivo fibroso a consecuencia del exceso de deposición de componentes de la matriz extracelular, por ejemplo, colágeno. El tejido conectivo fibroso se caracteriza por tener matriz extracelular (MEC) con un elevado contenido de colágeno. El colágeno puede proporcionarse en hebras o fibras, que puede estar dispuesto de manera irregular o alineado. La MEC de tejido conectivo fibroso también puede incluir glucosaminoglucanos.

Tal como se usa en el presente documento, "exceso de tejido conectivo fibroso" se refiere a una cantidad de tejido conectivo en una ubicación dada (por ejemplo, un tejido u órgano dado o parte de un tejido u órgano dado) que es mayor que la cantidad de tejido conectivo presente en esa ubicación en ausencia de fibrosis, por ejemplo, en condiciones normales no patológicas. Tal como se usa en el presente documento, "exceso de deposición de componentes de la matriz extracelular" se refiere a un nivel de deposición de uno o más componentes de la matriz extracelular que es mayor que el nivel de deposición en ausencia de fibrosis, por ejemplo, en condiciones normales no patológicas.

Los mecanismos celulares y moleculares de la fibrosis se describen en Wynn, J. *Pathol.* (2008) 214(2): 199-210 y Wynn y Ramalingam, *Nature Medicine* (2012) 18:1028-1040.

Los efectores celulares principales de la fibrosis son los miofibroblastos, que producen una matriz extracelular rica en colágeno.

En respuesta a una lesión tisular, las células dañadas y los leucocitos producen factores profibróticos, tales como TGF β , IL-13 y PDGF, que activan a los fibroblastos en miofibroblastos que expresan α SMA y reclutan a los miofibroblastos en el sitio de la lesión. Los miofibroblastos producen una gran cantidad de matriz extracelular y son mediadores importantes para ayudar a contraer y cerrar la herida. Sin embargo, en condiciones de infección persistente o durante la inflamación crónica, puede haber una sobre activación y reclutamiento de miofibroblastos y por lo tanto, una sobreproducción de componentes de la matriz extracelular, dando como resultado la formación de un exceso de tejido conectivo fibroso.

En algunas realizaciones, la fibrosis puede estar desencadenada por patologías, por ejemplo, afecciones, infecciones o enfermedades que ocasionan la producción de factores profibróticos, tales como TGF β 1. En algunas realizaciones, la fibrosis puede estar causada por una lesión/estímulo físico, lesión/estímulo químico o lesión/estímulo ambiental. Una lesión/estímulo físico puede producirse durante una cirugía, por ejemplo, causas iatrogénicas. La lesión/estímulo químico puede incluir fibrosis inducida por fármacos, por ejemplo, después de la administración crónica de fármacos, tales como bleomicina, ciclofosfamida, amiodarona, procainamida, penicilamina, oro y nitrofurantoína (Daba et al., *Saudi Med J*, junio de 2004; 25(6): 700-6). La lesión/estímulo ambiental puede incluir exposición a fibras de amianto o sílice.

La fibrosis puede producirse en diversos tejidos del cuerpo. Por ejemplo, la fibrosis puede producirse en el hígado (por ejemplo, cirrosis), pulmones, el riñón, el corazón, vasos sanguíneos, los ojos, la piel, el páncreas, el intestino, el cerebro y la médula ósea. La fibrosis también puede producirse en varios órganos a la vez.

En las realizaciones del presente documento, la fibrosis puede implicar un órgano del sistema gastrointestinal, por ejemplo, del hígado, el intestino delgado, el intestino grueso o el páncreas. En algunas realizaciones, la fibrosis puede implicar un órgano del sistema respiratorio, por ejemplo, los pulmones. En realizaciones, la fibrosis puede

5 implicar un órgano del sistema cardiovascular, por ejemplo, del corazón o los vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, la fibrosis puede implicar la piel. En algunas realizaciones, la fibrosis puede implicar un órgano del sistema nervioso, por ejemplo, el cerebro. En algunas realizaciones, la fibrosis puede implicar un órgano del sistema urinario, por ejemplo, los riñones. En algunas realizaciones, la fibrosis puede implicar un órgano del sistema musculoesquelético, por ejemplo, tejido muscular.

10 En algunas realizaciones preferidas, la fibrosis es cardíaca o fibrosis del miocardio, fibrosis hepática o fibrosis renal. En algunas realizaciones, la fibrosis cardíaca o de miocardio se asocia con una disfunción en la musculatura o las propiedades eléctricas del corazón o un engrosamiento de las paredes de las válvulas del corazón. En algunas realizaciones, la fibrosis se encuentra en la aurícula y/o los ventrículos del corazón. El tratamiento de la fibrosis auricular o ventricular puede ayudar a reducir el riesgo o la aparición de fibrilación auricular, fibrilación ventricular o infarto de miocardio.

15 En algunas realizaciones preferidas, la fibrosis hepática se asocia con la enfermedad hepática crónica o la cirrosis hepática. En algunas realizaciones preferidas, la fibrosis renal se asocia con la enfermedad renal crónica.

20 Las enfermedades/afecciones caracterizadas por la fibrosis de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero sin limitación: afecciones respiratorias, tales como fibrosis pulmonar, fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis masiva progresiva, esclerodermia, bronquiolitis obliterante, síndrome de Hermansky-Pudlak, asbestosis, silicosis, hipertensión pulmonar crónica, hipertensión pulmonar asociada con el SIDA, sarcoidosis, estroma tumoral en la enfermedad pulmonar y asma; enfermedad hepática crónica, cirrosis biliar primaria (PBC), enfermedad hepática esquistosomal, cirrosis hepática; afecciones cardiovasculares, tales como cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada (CMD), fibrosis auricular, fibrilación auricular, fibrosis ventricular, fibrilación ventricular, fibrosis del miocardio, síndrome de Brugada, miocarditis, fibrosis endomiocárdica, infarto de miocardio, enfermedad vascular fibrótica, patología cardíaca hipertensiva, cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica (ARVC), fibrosis tubulointersticial y glomerular, aterosclerosis, venas varicosas, infartos cerebrales; afecciones neurológicas, tales como gliosis y enfermedad de Alzheimer; distrofia muscular, tal como distrofia muscular de Duchenne (DMD) o distrofia muscular de Becker (BMD); afecciones gastrointestinales, tales como enfermedad de Crohn, colitis microscópica y colangitis esclerosante primaria (PSC); afecciones cutáneas, tales como esclerodermia, fibrosis sistémica nefrogénica y queloides cutáneos; artrofibrosis; contractura de Dupuytren; fibrosis del mediastino; fibrosis retroperitoneal; mielofibrosis; enfermedad de Peyronie; capsulitis adhesiva; enfermedad renal (por ejemplo, fibrosis renal, síndrome nefrítico, síndrome de Alport, nefropatía asociada con VIH, enfermedad renal poliquística, enfermedad de Fabry, nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefritis asociada con lupus sistémico); esclerosis sistémica progresiva (ESP); enfermedad crónica de injerto contra hospedador; enfermedades de los ojos, tales como oftalmopatía de Grave, fibrosis epirretinal, fibrosis retinal, fibrosis subretinal (por ejemplo, asociada con la degeneración macular (por ejemplo, degeneración macular asociada con la edad húmeda (AMD)), retinopatía diabética, glaucoma, fibrosis corneal, fibrosis postquirúrgica (por ejemplo, de la cápsula posterior después de una cirugía de cataratas o de la ampolla después de una trabeculectomía para el glaucoma), fibrosis conjuntiva, fibrosis subconjuntiva; artritis; enfermedad fibrótica preneoplásica y fibrótica neoplásica; y fibrosis inducida por una lesión química o ambiental (por ejemplo, quimioterapia del cáncer, plaguicidas, radiación/radioterapia para el cáncer).

45 Se apreciará que varias de estas enfermedades/afecciones listadas anteriormente están interrelacionadas. Por ejemplo, la fibrosis ventricular puede producirse después de un infarto de miocardio y se asocia con la CMD, la CMH y la miocarditis.

50 En realizaciones particulares, la enfermedad/trastorno puede ser uno de fibrosis pulmonar, fibrilación auricular, fibrilación ventricular, cardiomiopatía hipertrófica (CMH), cardiomiopatía dilatada (CMD), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis, enfermedad renal crónica, esclerodermia, esclerosis sistémica, queloides, fibrosis quística, enfermedad de Crohn, fibrosis postquirúrgica o fibrosis retinal.

El tratamiento, la prevención o el alivio de la fibrosis de acuerdo con la presente divulgación puede ser de fibrosis asociada con una regulación positiva de IL-11, por ejemplo, una regulación positiva de IL-11 en células o tejido en el que se produce o puede producirse la fibrosis o regulación positiva de IL-11 o IL-11R extracelular.

55 El tratamiento o alivio de la fibrosis puede ser eficaz para prevenir la progresión de la fibrosis, por ejemplo, para prevenir el empeoramiento de la afección o para frenar la velocidad de desarrollo de la fibrosis. En algunas realizaciones, el tratamiento o el alivio pueden ocasionar una mejora de la fibrosis, por ejemplo, una reducción en la cantidad de fibras de colágeno depositadas.

60 La prevención de la fibrosis puede referirse a la prevención de un empeoramiento de la afección o a la prevención del desarrollo de fibrosis, por ejemplo, prevenir el desarrollo de un estadio temprano de fibrosis hacia un estadio crónico tardío.

Sujeto

El sujeto que se va a tratar puede ser un animal o un ser humano. El sujeto es preferentemente un mamífero, más preferentemente, un ser humano. El sujeto puede ser un mamífero no humano, pero más preferentemente, es un ser humano. El sujeto puede ser masculino o femenino. El sujeto puede ser un paciente.

Muestra

Una muestra obtenida de un sujeto puede ser de cualquier tipo. Puede tomarse una muestra biológica de cualquier tejido o fluido corporal, por ejemplo, una muestra de sangre, muestra procedente de la sangre, muestra de suero, muestra de linfa, muestra de semen, muestra de saliva, muestra de fluido sinovial. Una muestra procedente de la sangre puede ser una fracción seleccionada de la sangre de un paciente, por ejemplo, una fracción seleccionada que contiene células o una fracción de plasma o suero. Una muestra puede comprender una muestra de tejido o biopsia; o células aisladas de un sujeto. Las muestras pueden recogerse mediante técnicas conocidas, tales como biopsia o aspiración con aguja. Las muestras pueden almacenarse y/o procesarse para la posterior determinación de los niveles de expresión de IL-11.

Las muestras pueden usarse para determinar la regulación positiva de IL-11 o IL-11R en el sujeto del que se obtuvo la muestra.

En algunas realizaciones preferidas, una muestra puede ser una muestra de tejido, por ejemplo, biopsia, tomada del corazón, hígado o tejido renal. En algunas realizaciones, una muestra puede ser una muestra de tejido, por ejemplo, biopsia, tomada de los ojos.

Una muestra puede contener células y preferentemente, puede contener fibroblastos y/o miofibroblastos. En algunas realizaciones, los fibroblastos o miofibroblastos pueden obtenerse del corazón, hígado o tejido renal, por ejemplo, pueden ser fibroblastos cardíacos o miofibroblastos cardíacos (véase, por ejemplo, Colby et al., Circulation Research 2009;105:1164-1176), fibroblastos hepáticos o miofibroblastos hepáticos (véase, por ejemplo, Zeisberg et al., The Journal of Biological Chemistry, 10 de agosto de 2007, 282, 23337-23347; Brenner., Fibrogenesis & Tissue Repair 2012, 5 (Supl 1):S17), fibroblastos renales o miofibroblastos renales (véase, por ejemplo, Strutz y Zeisberg. JASN noviembre de 2006, vol. 17 n.º 11 2992-2998). En algunas realizaciones, los fibroblastos o miofibroblastos pueden obtenerse de tejido ocular, por ejemplo, pueden ser fibroblastos corneales.

Regulación positiva de la expresión de IL-11 o IL-11R

Algunos aspectos y realizaciones de la presente divulgación se refieren a la detección de la expresión de IL-11 o IL-11R, por ejemplo, en una muestra obtenida de un sujeto.

En algunos aspectos y realizaciones, la presente divulgación se refiere a la regulación positiva de la expresión (sobreexpresión) de IL-11 o IL-11R (en forma de proteína o de oligonucleótido que codifica la IL-11 o IL-11R respectiva) y a la detección de dicha regulación positiva como indicador de la idoneidad del tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 o con un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R.

La regulación positiva de la expresión de IL-11 o IL-11R comprende la expresión de IL-11 o IL-11R a un nivel que es mayor del que normalmente cabría esperar para una célula o tejido de un tipo concreto. La regulación positiva puede determinarse determinando el nivel de expresión de IL-11 o IL-11R en una célula o tejido. Puede hacerse una comparación entre el nivel de expresión de IL-11 o IL-11R en una célula o muestra de tejido y un nivel de referencia de IL-11 o IL-11R, por ejemplo, un valor o intervalo de valores que representan un nivel de expresión normal de IL-11 o IL-11R para la misma célula o tipo de tejido o uno correspondiente. En algunas realizaciones, pueden determinarse los niveles de referencia detectando la expresión de IL-11 o IL-11R en una muestra de control, por ejemplo, en células o tejido correspondientes de un sujeto sano o de tejido sano del mismo sujeto. En algunas realizaciones, pueden obtenerse niveles de referencia a partir de una curva patrón o un conjunto de datos.

Los niveles de expresión pueden cuantificarse para su comparación absoluta o pueden efectuarse comparaciones relativas.

En algunas realizaciones, la regulación positiva de IL-11 o IL-11R puede considerarse presente cuando el nivel de expresión en la muestra de ensayo es al menos 1,1 veces el de un nivel de referencia. Más preferentemente, el nivel de expresión puede seleccionarse entre uno de al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2,0, al menos 2,1, al menos 2,2, al menos 2,3, al menos 2,4, al menos 2,5, al menos 2,6, al menos 2,7, al menos 2,8, al menos 2,9, al menos 3,0, al menos 3,5, al menos 4,0, al menos 5,0, al menos 6,0, al menos 7,0, al menos 8,0, al menos 9,0 o al menos 10,0 veces el del nivel de referencia.

Pueden determinarse los niveles de expresión de IL-11 o IL-11R mediante uno de una serie de técnicas de ensayo *in vitro* conocidas, tales como ensayos basados en la PCR, ensayos de hibridación *in situ*, ensayos por citometría de

flujo, ensayos inmunológicos o ensayos inmunohistoquímicos.

A modo de ejemplo, las técnicas adecuadas implican un método para determinar el nivel de IL-11 o IL-11R en una muestra poniendo en contacto la muestra con un agente capaz de unirse a IL-11 o IL-11R y detectar la formación de un complejo del agente e IL-11 o IL-11R. El agente puede ser cualquier molécula de unión adecuada, por ejemplo, un anticuerpo, polipéptido, péptido, oligonucleótido, aptámero o molécula pequeña y opcionalmente, puede estar marcado para permitir la detección, por ejemplo, visualización, de los complejos formados. Los marcadores y medios adecuados para su detección son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, eosina y NDB, proteína fluorescente verde (GFP), quelatos de tierras raras, tales como europio (Eu), terbio (Tb) y samario (Sm), tetrametil rodamina, rojo Texas, 4-metil umbeliferona, 7-amino-4-metil cumarina, Cy3, Cy5), marcadores isotópicos, radioisótopos (por ejemplo, ³²P, ³³P, ³⁵S), marcadores quimioluminiscentes (por ejemplo, éster de acridinio, luminol, isoluminol), enzimas (por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, luciferasa), anticuerpos, ligandos y receptores. Las técnicas de detección son bien conocidas por los expertos en la materia y pueden seleccionarse para que sean correspondientes al agente de marcaje. Las técnicas adecuadas incluyen amplificación de marcadores oligonucleotídicos mediante la PCR, espectrometría de masas, detección de fluorescencia o color, por ejemplo, tras la conversión enzimática de un sustrato por una proteína indicadora o detección de radiactividad.

Los ensayos pueden configurarse para cuantificar la cantidad de IL-11 o IL-11R en una muestra. Las cantidades cuantificadas de IL-11 o IL-11R de una muestra de ensayo pueden compararse con valores de referencia y usarse esta comparación para determinar si la muestra de ensayo contiene una cantidad de IL-11 o IL-11R que es mayor o menor que la del valor de referencia hasta un grado seleccionado de significación estadística.

La cuantificación de IL-11 o IL-11R detectado puede usarse para determinar la regulación positiva o negativa o la amplificación de los genes que codifican IL-11 o IL-11R. En los casos donde la muestra contenga células fibróticas, dicha regulación positiva, regulación negativa o amplificación puede compararse con un valor de referencia para determinar si hay presencia de cualquier diferencia estadísticamente significativa.

Selección de sujetos

Puede seleccionarse un sujeto para su tratamiento basándose en la determinación de si el sujeto tiene un nivel regulado positivamente de expresión de IL-11 o IL-11R. Por lo tanto, IL-11 o IL-11R pueden actuar como un marcador de la fibrosis, que es adecuado para el tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 o con un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R.

La regulación positiva puede ser en un tejido dado o en células seleccionadas de un tejido dado. Un tejido preferido puede ser uno de corazón, hígado o riñón. Un tejido preferido puede ser ocular. Un tipo de célula preferido puede ser fibroblastos o miofibroblastos. La regulación positiva también puede determinarse en un fluido circulante, por ejemplo, sangre o en una muestra procedente de la sangre. La regulación positiva puede ser de IL-11 o IL-11R extracelular.

La determinación de los niveles de IL-11 o IL-11R puede llevarse a cabo mediante ensayo, preferentemente *in vitro*, en una muestra obtenida de un sujeto, como se describe en el presente documento.

Después de la selección, se puede administrar a un sujeto un tratamiento para la fibrosis mediante la administración de un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 o de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R.

En algunas realizaciones, un sujeto puede recibir un diagnóstico de fibrosis, ser sospechoso de tener fibrosis o considerarse en riesgo de desarrollar fibrosis y sería interesante conocer si el sujeto se beneficiará del tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de IL-11 o con un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R. En dichas realizaciones, puede determinarse la idoneidad del sujeto para dicho tratamiento determinando si está regulada positivamente la expresión de la IL-11 o del IL-11R en el sujeto. En algunas realizaciones, la expresión de IL-11 o IL-11R está regulada positivamente de manera local o sistémica en el sujeto.

Diagnóstico y pronóstico

La detección de la regulación positiva de la expresión de IL-11 o IL-11R también puede usarse en un método para diagnosticar la fibrosis o del riesgo de desarrollar fibrosis en un sujeto y en métodos para pronosticar o predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de IL-11 o de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R.

En algunas realizaciones, puede sospecharse que un sujeto tiene fibrosis, por ejemplo, basándose en la presencia de otros síntomas indicativos de fibrosis en el cuerpo del sujeto o en células/tejidos seleccionados del cuerpo del sujeto o considerarse que está en riesgo de desarrollar fibrosis, por ejemplo, debido a una predisposición genética o a la exposición a condiciones ambientales, tales como fibras de amianto.

La determinación de la regulación positiva de IL-11 o IL-11R puede confirmar un diagnóstico o un diagnóstico de sospecha de fibrosis o puede confirmar que el sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar fibrosis. La determinación también puede diagnosticar la afección o la predisposición como idónea para el tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 o de un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R.

5 Como tal, puede proporcionarse un método para proporcionar un pronóstico para un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene fibrosis, comprendiendo el método determinar si la IL-11 o el IL-11R está regulado positivamente en una muestra obtenida del sujeto y, basándose en la determinación, proporcionar un pronóstico para el tratamiento del sujeto con un agente capaz de inhibir la acción de la IL-11 o un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de la IL-11 o del IL-11R.

15 En algunos aspectos, los métodos de diagnóstico o los métodos para pronosticar o predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de IL-11 o un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R pueden no necesitar la determinación de los niveles de IL-11 o IL-11R, pero puede estar basado en la determinación de factores genéticos en el sujeto que predicen la regulación positiva de la expresión de la IL-11 o del IL-11R o la regulación positiva de la actividad de la IL-11 o del IL-11R. Dichos factores genéticos pueden incluir la determinación de mutaciones genéticas, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o amplificación génica en IL-11 y/o IL-11R que están correlacionados con y/o predicen la regulación positiva de la expresión o actividad de IL-11 o IL-11R o la actividad de señalización mediada por IL-11. Se conoce en la técnica el uso de factores genéticos para predecir la predisposición a una patología o la respuesta al tratamiento, véase, por ejemplo, Peter Stärkel *Gut* 2008;57:440-442; Wright et al., *Mol. Cell. Biol.* marzo de 2010 vol. 30 n.º 6 1411-1420.

25 Los factores genéticos pueden evaluarse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo ensayos basados en la PCR, por ejemplo, PCR cuantitativa, PCR competitiva. Al determinar la presencia de factores genéticos, por ejemplo, en una muestra obtenida de un sujeto, puede confirmarse un diagnóstico de fibrosis y/o puede clasificarse a un sujeto como en riesgo de desarrollar fibrosis y/o puede identificarse un sujeto como idóneo para el tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de IL-11 o un agente capaz de prevenir o reducir la expresión de IL-11 o IL-11R.

30 Algunos métodos pueden comprender la determinación de la presencia de uno o más SNP ligados a la secreción de IL-11 o a la susceptibilidad al desarrollo de fibrosis. Los SNP son normalmente bialélicos y por lo tanto, pueden determinarse fácilmente usando uno de una serie de ensayos convencionales conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Anthony J. Brookes. *The essence of SNPs*. *Gene Volumen 234*, 2ª edición, 8 de julio de 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).

40 Los métodos pueden comprender la determinación de qué alelo de SNP está presente en una muestra obtenida de un sujeto. En algunas realizaciones, la determinación de la presencia del alelo menor puede estar asociada con un aumento de la secreción de IL-11 o con la susceptibilidad al desarrollo de fibrosis.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de exploración de un sujeto, comprendiendo el método:

45 obtener una muestra de ácido nucleico del sujeto;
determinar qué alelo está presente en la muestra en la posición de nucleótido polimórfico de uno o más de los SNP listados en la figura 33 y/o la figura 34 y/o la figura 35 o un SNP en desequilibrio de unión con uno de os NP listados con una $r^2 \geq 0,8$.

50 La etapa de determinación puede comprender determinar si el alelo menor está presente en la muestra en la posición de nucleótido polimórfica. Puede comprender determinar si están presentes 0, 1 o 2 alelos menores.

El método de exploración puede ser o formar parte de, un método para determinar la susceptibilidad del sujeto a desarrollar fibrosis o un método de diagnóstico o pronóstico como se describe en el presente documento.

55 El método puede comprender además la etapa de identificar que el sujeto tiene susceptibilidad o un riesgo aumentado de desarrollar fibrosis, por ejemplo, en caso de que se determine que el sujeto tiene un alelo menor en la posición del nucleótido polimórfico. El método puede comprender además la etapa de seleccionar al sujeto para su tratamiento con un agente capaz de inhibir la acción de la interleucina 11 (IL-11) y/o administración al sujeto de un agente capaz de inhibir la acción de la interleucina 11 (IL-11) para proporcionar un tratamiento para la fibrosis en el sujeto o para prevenir el desarrollo o la progresión de la fibrosis en el sujeto.

65 Los SNP que pueden determinarse incluyen uno o más de los SNP listados en la figura 33, la figura 34 o la figura 35. En algunas realizaciones, el método puede comprender determinar uno o más de los SNP listados en la figura 33. En algunas realizaciones, el método puede comprender determinar uno o más de los SNP listados en la figura 34. En algunas realizaciones, el método puede comprender determinar uno o más de los SNP listados en la figura 35.

Los SNP pueden seleccionarse para determinar si tienen un bajo valor de P o de FDR (tasa de falso descubrimiento).

5 En algunas realizaciones, los SNP se seleccionan como buenos predictores de la respuesta al tratamiento anti-IL-11 basándose en la regulación de VSTestim en *trans* (figura 33). En algunas realizaciones, un método puede comprender determinar qué alelo está presente para uno o más de los siguientes SNP: rs10831850, rs4756936, rs6485827, rs7120273 y rs895468. En algunas realizaciones, los SNP se seleccionan como buenos predictores de la respuesta al tratamiento anti-IL-11 basándose en la regulación de VSTestim-VSTnoestim en *cis* (figura 34).

10 En algunas realizaciones, los SNP se seleccionan como buenos predictores de la respuesta al tratamiento anti-IL-11 basándose en la regulación de VSTestim-VSTnoestim en *trans* (figura 35). En algunas realizaciones, un método puede comprender determinar qué alelo está presente para uno o más de los siguientes SNP: rs7120273, rs10831850, rs4756936, rs6485827 (figura 35).

15 Los SNP rs7120273, rs10831850, rs4756936, rs6485827 se encuentran en alto desequilibrio de enlace (LD) entre sí en el cromosoma 11 (en el denominado bloque LD) y por lo tanto, se heredan de manera conjunta con elevada frecuencia.

20 El cuadrado de la correlación de frecuencias génicas (r^2) refleja el grado de desequilibrio de enlace (LD) entre dos SNP. Como resultado del LD entre los SNP en las regiones locales y por lo tanto heredadas de manera conjunta del genoma, puede inferirse el genotipo de un SNP determinado el genotipo de un marcador/indicador de SNP. El intercambio de LD usado en la técnica para identificar marcadores/indicadores de SNP emparejados es un valor de r^2 de 0,8 (Wang et al. 2005, Nat. Rev. Genet. 6(2): 109-18; Barrett et al. 2006, Nat Genet., 38 (6): 659-662). Por lo tanto, puede inferirse el genotipo de un SNP determinando el genotipo de un marcador/indicador de SNP en desequilibrio de unión con un valor de $r^2 \geq 0,8$.

30 La secuencia de nucleótidos de los SNP se indica usando el número "rs". La secuencia completa se encuentra disponible en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de polimorfismos de un solo nucleótido (dbSNP) que se encuentra accesible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

35 Los métodos de diagnóstico o pronóstico pueden llevarse a cabo *in vitro* en una muestra obtenida de un sujeto o después del procesado de una muestra obtenida de un sujeto. Una vez que se ha recogido la muestra, no es necesaria la presencia del paciente para llevar a cabo el método de diagnóstico o pronóstico *in vitro* y por lo tanto, el método puede ser uno que no se practica en el cuerpo humano o del animal.

Pueden usarse otras pruebas diagnósticas o pronósticas junto con las aquí descritas para mejorar la precisión del diagnóstico o pronóstico o para confirmar un resultado obtenido usando las pruebas aquí descritas.

40 Los métodos de acuerdo con la presente divulgación pueden llevarse a cabo o los productos pueden estar presentes, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Se pretende que la expresión "*in vitro*" abarque experimentos con materiales, sustancias biológicas, células y/o tejidos en condiciones de laboratorio o en cultivo, mientras que la expresión "*in vivo*" pretende abarcar experimentos y procedimientos con organismos multicelulares intactos. "*Ex vivo*" se refiere a algo presente o que se produce fuera de un organismo, por ejemplo, fuera del cuerpo humano o del animal, que puede estar en tejido (por ejemplo, órganos completos) o células extraídas del organismo.

45 La presente divulgación incluye la combinación de los aspectos y las características preferidas descritas, salvo en los casos donde dicha combinación es claramente imprevisible o se evita de manera expresa.

50 Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente, y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita.

55 A continuación se ilustrarán los aspectos y realizaciones de la presente divulgación, a modo de ejemplo, haciendo referencia a las figuras adjuntas. Los aspectos y realizaciones adicionales serán evidentes para los expertos en la materia.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, a menos que le contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y las variaciones, tales como "comprende" y "comprendiendo" implican la inclusión de un número entero o etapa indicada o un grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

60 Debe destacarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el" o "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Los intervalos se pueden expresar como desde "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular constituye otra realización.

Breve descripción de las Figuras

Las realizaciones y experimentos que ilustran los principios de la invención se describirán a continuación por referencia a las figuras adjuntas, en las que:

5 **Figura 1.** La estimulación con TGFβ1 regula positivamente la IL-11 en fibroblastos. Los fibroblastos primarios se obtuvieron de tejido auricular humano de 80 individuos y se incubó durante 24 h con y sin TGFβ1 (5ng/ml). (a) Diagrama que muestra que IL-11 era el gen más regulado positivamente en los fibroblastos estimulados con TGFβ1 en comparación con 11.433 genes expresados (FPKM ≥ 0,5). (b) Diagrama que muestra que la expresión de IL-11 aumentó significativamente más de 8 veces de media tras la activación de fibroblastos con TGFβ1 (FDR = $9,1 \times 10^{-125}$), (c) Diagrama que muestra que la RT-qPCR confirmó los múltiplos de cambio basados en la expresión de ARN de IL-11 (TGFB1+/TGFB1-; $R^2=0,94$) y (d) Diagrama que muestra que el ELISA detectó un aumento significativo en la proteína IL-11 secretada por fibroblastos estimulados.

15 **Figura 2.** Se incubaron fibroblastos auriculares humanos con 5 ng/ml de TGFβ1 o con 5 ng/ml de IL-11 durante 24 horas. Diagramas que muestran la tinción celular para (a) α-SMA (miofibroblastos), (b) EdU (proliferación), (c) colágeno (d) periostina para identificar miofibroblastos y células altamente proliferativas y para cuantificar la producción de proteínas de la matriz extracelular. Se observó que la IL-11 aumentaba la proporción de miofibroblastos e inducía la producción de colágeno y periostina a una tasa similar que la señalización de TGFβ1. Este experimento se repitió una serie de veces con resultados similares.

25 **Figura 3.** La inhibición de IL-11 con un anticuerpo neutralizante previene la fibrosis inducida por TGFβ1. Se estimularon fibroblastos auriculares humanos con TGFβ1 (5ng/ml), TGFβ1 y un anticuerpo contra IL-11 o TGFβ1 y un control de isotipo. Los diagramas y fotografías muestran células teñidas tras 24 horas para (a) α-SMA, (b) EdU, (c) colágeno (d) periostina para identificar miofibroblastos y células altamente proliferativas y para cuantificar la producción de proteínas de la matriz extracelular. La fluorescencia se cuantificó en la plataforma Operetta para hasta 21 campos por condición. Este experimento se repitió con fibroblastos procedentes de diferentes individuos con resultados similares. En presencia de un anticuerpo que bloquee IL-11, los fibroblastos estimulados con TGFβ1 tienen una proporción de miofibroblastos reducida, son menos proliferativos y expresan menos colágeno y periostina en comparación con las células de control. Esto demuestra que IL-11 es un componente esencial de la vía de señalización de TGFβ1 que actúa de un modo de alimentación anterógrada autocrina y/o paracrina y su inhibición reduce los efectos profibróticos de este regulador clave de la fibrosis en seres humanos.

35 **Figura 4.** La estimulación con TGFβ1 regula positivamente la IL-11 en fibroblastos. Los fibroblastos primarios se obtuvieron de tejido auricular humano de 80 individuos y se incubó durante 24 h con y sin TGFβ1 (5ng/ml). (a) Diagrama que muestra que IL-11 era el transcrito de ARN más regulado positivamente en los fibroblastos estimulados con TGFβ1 en comparación con 11.433 genes expresados (FPKM ≥ 0,5) a lo largo del genoma, evaluado mediante elaboración de perfiles de transcriptoma globales, (b) Diagrama que muestra que la expresión de IL-11 en fibroblastos humanos primarios no estimulados (TGF-β⁻) y estimulados (TGF-β⁺) en comparación con todos los tejidos humanos evaluada por el proyecto GTEx (Consortium, Gte. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science (Nueva York, N.Y.)* 348, (2015)) revela una alta especificidad de niveles de IL-11 elevados para fibroblastos y específicamente, fibroblastos activados, cuya firma no se aprecia a nivel del órgano completo que contiene múltiples tipos celulares y pocos fibroblastos que expresan IL-11.

50 **Figura 5.** La IL-11 actúa como factor autocrino en los fibroblastos e induce su propia expresión a través únicamente de la regulación traduccional. Se estimuló durante 24 horas a fibroblastos primarios con TGF-β, (a) Diagrama que muestra que la expresión de ARN de IL-11 aumentó significativamente (FDR = $9,1 \times 10^{-125}$) más de 8 veces de media entre 80 individuos. (b) Diagrama que muestra los resultados de un ensayo ELISA que confirma un aumento significativo en la proteína IL-11 secretada por fibroblastos estimulados (prueba de la t). (c) Diagrama que muestra que la incubación de fibroblastos primarios con IL-11 no aumenta los niveles de ARN de IL-11 (RT-qPCR). (d) Diagrama que muestra que la incubación de fibroblastos primarios con IL-11 induce de manera significativa (Dunnett) la secreción de proteína IL-11, detectada mediante ELISA. Los valores de P ajustados se proporcionan como **** P < 0,0001.

60 **Figura 6.** IL-11 dirige la proliferación y activación de fibroblastos, así como la producción de matriz extracelular y es necesaria para la respuesta fibrótica mediada por TGFβ1. Se incubaron fibroblastos cardiacos procedentes de 3 individuos durante 24 h con TGFβ1 (5 ng/ml), IL-11 (5 ng/ml) o TGFβ1 y un anticuerpo neutralizante de IL-11/de control. Los diagramas y fotografías muestran los resultados de la tinción celular después de la incubación para (a) contenido de α-SMA para estimar la fracción de miofibroblastos, (b) EdU para rastrear células que proliferan activamente y (c) periostina para estimar la producción de MEC. La fluorescencia se midió con la plataforma Operetta para 14 campos a lo largo de 2 pocillos para cada paciente. Los diagramas también muestran la secreción de los marcadores de fibrosis IL-6 (d), TIMP1 (e) y MMP2 (f) evaluada mediante ELISA. La fluorescencia se normalizó al grupo de control sin estimulación y se representa gráficamente la media con la desviación estándar. IL-11 induce una respuesta fibrótica a niveles similares a los de TGFβ1 y la inhibición de IL-

11 rescata el fenotipo de TGFβ1 a nivel de proteína. Los valores de P ajustados se proporcionan como * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 o **** P < 0,0001 de los grupos experimentales, en comparación con las células no estimuladas (Dunnett). Los valores anómalos se retiraron (ROUT, Q = 2 %).

5 **Figura 7.** IL-11 promueve la síntesis de la proteína de colágeno y detiene el efecto profibrótico de TGFβ1 a nivel de ARN. Se incubaron fibroblastos cardíacos procedentes de 3 individuos durante 24 h con TGFβ1 (5 ng/ml), IL-11 (5 ng/ml) o TGFβ1 y un anticuerpo neutralizante de IL-11. Después de la incubación, (a) Diagrama que muestra los resultados después de la incubación de la tinción celular para colágeno usando el ensayo Operetta; la fluorescencia se cuantificó como se ha descrito anteriormente para la figura 6, (b) Diagrama que muestra los niveles de colágeno secretado evaluados con una tinción de rojo de Siria y (c) Diagrama que muestra los niveles de ARN de colágeno medidos mediante RT-qPCR. La IL-11 induce una respuesta fibrótica a niveles similares a los de TGFβ1 solo a nivel de proteína. Una mayor expresión de transcritos de ARN de colágeno por TGFβ1 no dio lugar a un aumento de la producción de proteína en caso de que se neutralizase IL-11 con un anticuerpo. Los valores de P ajustados se proporcionan como * P < 0,05, ** P < 0,001 o **** P < 0,0001 de los grupos experimentales, en comparación con el grupo de control de células no estimuladas (Dunnett).

15 **Figura 8.** La IL-11 es un marcador y activador de la fibrosis en múltiples tejidos. La expresión de IL-11 puede inducirse mediante un conjunto diverso de estimulantes profibróticos aguas arriba, además de TGFβ1. (a) Diagrama que muestra el efecto de TGFβ1 en la expresión de IL-11, (b) Diagrama que muestra que ET-1 (endotelina) regula positivamente la IL-11 en los fibroblastos hepáticos y pulmonares; (c) Diagrama que muestra que PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) induce la expresión de IL-11 en fibroblastos renales. Los niveles de ARN de IL-11 se midieron mediante RT-qPCR; los valores de P ajustados se proporcionan como * P < 0,05, ** P < 0,01 o **** P < 0,0001 (Dunnett). Para investigar el efecto sistémico de la IL-11, se inyectó solo suero salino (gris) o IL-11 recombinante (negro) 6 veces a la semana en ratones C57BL/6 (200µg/kg). El contenido de colágeno en el tejido se evaluó con un ensayo de hidroxiprolina (QuickZyme) a nivel de proteína y los resultados se muestran en el diagrama (d). Los tejidos de animales tratados con rIL-11 tienen un mayor contenido de proteína de colágeno que los controles (ANOVA; p= 0,012). (e) Fotografías de transferencias de Western que muestran que los niveles de αSMA están aumentados en el riñón y el corazón de ratones tratados con IL-11, lo que indica la presencia de miofibroblastos.

20 **Figura 9.** Diagrama que ilustra el papel de la IL-11 como regulador esencial de la respuesta fibrótica. La IL-11 es un regulador esencial necesario para la respuesta fibrótica. En respuesta al daño tisular o a la inflamación crónica, se liberan citocinas, tales como TGFβ1, ET-1 o PDGF para regular positivamente la transcripción de genes marcadores de fibrosis. Después, se produce el agente autocrino IL-11 en respuesta a estos estímulos aguas arriba para asegurar una traducción eficaz de los transcritos regulados positivamente en proteínas funcionalmente relevantes de una manera específica de células. La inhibición de IL-11 bloquea la síntesis de proteínas clave de la matriz extracelular y de miofibroblastos y previene la acción profibrótica de un conjunto diverso de estímulos aguas arriba.

25 **Figura 10.** La inhibición de IL-11 detiene la síntesis de proteína de colágeno en respuesta a las citocinas profibróticas ANG2 (angiotensina II), PDGF y ET-1. Se incubaron fibroblastos cardíacos durante 24 h con ANG2, PDGF o ET-1 y un anticuerpo neutralizante de IL-11. Después de la incubación, se tiñeron las células para colágeno y se cuantificó la fluorescencia. Estos estímulos indujeron una respuesta fibrótica a niveles similares a los de TGFβ1. Sin embargo, la expresión de colágeno no aumentó en caso de que la IL-11 se neutralizase con un anticuerpo. Los valores de P se proporcionan como: **** P < 0,0001 (prueba de la t).

30 **Figura 11.** Secuencia de nucleótidos de IL-11 humana, tomada del número de referencia de GenBank gi|391353405|ref|NM_000641.3 (interleucina 11 (IL11) de *Homo sapiens*, variante de transcrito 1, ARNm) [SEQ ID NO: 1]. La secuencia subrayada codifica ARNm de IL-11. Las secuencias sombreadas se usaron para el diseño de ARNpi de silenciamiento génico de IL-11 y se muestran por separado como las SEQ ID NO: 2 a 5. Las SEQ ID NO: 3 y 4 se solapan entre sí en la SEQ ID NO: 1.

35 **Figura 12.** Secuencia de nucleótidos de IL-11Rα humano, tomada del número de referencia de GenBank gi|975336|gb|U32324.1|HSU32324 (ARNm de la cadena alfa del receptor de interleucina-11 humana, cds completo) [SEQ ID NO: 6]. La secuencia subrayada codifica ARNm de IL-11Rα. Las secuencias sombreadas se usaron para el diseño de ARNpi de silenciamiento génico de IL-11Rα y se muestran por separado como las SEQ ID NO: 7 a 10.

40 **Figura 13.** Tabla que muestra las secuencias de ARNpi [SEQ ID NO: 11 a 14] para el silenciamiento génico de la IL-11.

45 **Figura 14.** Tabla que muestra las secuencias de ARNpi [SEQ ID NO: 15 a 18] para el silenciamiento génico de la IL-11Rα.

50 **Figura 15.** Diagrama que muestra el silenciamiento génico con ARNpi de IL-11Rα en células HEK.

Figura 16. Gráfica que muestra la profundidad de lectura para la secuenciación del transcriptoma completo de fibroblastos auriculares humanos de 160 individuos con y sin estimulación con TGFβ1.

Figura 17. Gráficas que muestran la expresión de genes marcadores endoteliales, de cardiomiocitos y de fibroblastos determinados mediante secuenciación de ARN del tejido de origen (muestras de tejido auricular humano, n=8) y cultivos de fibroblastos primarios no estimulados. **(A)** PECAM1, **(B)** MYH6 **(C)** TNNT2, **(D)** COL1A2 y **(E)** ACTA2.

Figura 18. Gráficas que muestran la regulación positiva de la IL-11 en fibroblastos en respuesta a la estimulación con TGFβ1. **(A y B)** Gráficas que muestran el múltiplo de cambio de la expresión génica en la fibrosis; la IL-11 es el gen más regulado positivamente en respuesta al tratamiento con TGFβ1. **(C)** Secreción de IL-11 por fibroblastos en respuesta a la estimulación con TGFβ1. **(D)** Comparación de la expresión génica de IL-11 en tejidos de individuos sanos y en fibroblastos auriculares, con o sin estimulación con TGFβ1. **(E)** Correspondencia del múltiplo de cambio en la expresión de IL-11 determinada mediante secuenciación de ARN frente a qPCR.

Figura 19. Gráficas que muestran la inducción de la secreción de IL-11 en fibroblastos primarios por diversas citocinas profibróticas, tal como se determina mediante ELISA. **(A)** TGFβ1, ET-1, AngII, PDGF, OSM e IL-13 inducen la secreción de IL-11 e IL-11 también induce la expresión de IL-11 en un bucle de retroalimentación positiva. **(B)** Gráfica que muestra que el ELISA detecta únicamente IL-11 nativa secretada por células y no detecta la IL-11 recombinante usada para la condición de estimulación de IL-11. **(C)** y **(D)** Se estimularon células con IL-11 recombinante, se midió el ARN de IL-11 y se midió el nivel de proteína IL-11 nativa en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA en los puntos de tiempo indicados.

Figura 20. Gráficas e imágenes que muestran la generación de miofibroblastos a partir de y la producción de MEC y la expresión de citocinas por, fibroblastos auriculares en respuesta a la estimulación con TGFβ1 o IL-11. **(A)** Generación de miofibroblastos y producción de MEC por fibroblastos auriculares primarios después de la estimulación con TGFβ1 o IL-11, medida mediante microscopía de fluorescencia después de la tinción para α-SMA, colágeno o periostina. **(B)** Contenido de colágeno del sobrenadante de cultivo celular determinado mediante tinción con rojo de Siria. Secreción de los marcadores de fibrosis **(C)** IL-6, **(D)** TIMP1 y **(E)** MMP2 medida mediante ELISA. **(F)** Activación de fibroblastos murinos por estimulación con IL-11 recombinante humana o de ratón. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001 [Media ± SD, Dunnett],

Figura 21. Gráficas que muestran el efecto profibrótico de la IL-11. **(A)** Pueden activarse fibroblastos de ratón procedentes de distintos tejidos de origen mediante IL-11 y muestran producción aumentada de MEC. [Media ± SD, Dunnett], La inyección en ratones de IL-11 o AngII recombinante da como resultado **(B)** un aumento en el peso de los órganos [Media ± DTM] y **(C)** un aumento en el contenido de colágeno (determinado mediante el ensayo HPA). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001 [Media ± SD, Dunnett],

Figura 22. Gráficas e imágenes que muestran que la IL-11 es necesaria para los efectos profibróticos de TGFβ1 en fibroblastos. **(A)** Generación de miofibroblastos y producción de MEC por fibroblastos auriculares primarios, con o sin estimulación con TGFβ1 y en presencia/ausencia de anticuerpo neutralizante anticuerpos anti-IL-11 o IgG de control de isotipo, medida mediante microscopía de fluorescencia después de la tinción para **(A)** α-SMA, **(B)** EdU o **(C)** periostina. **(D a F)** La secreción de los marcadores de fibrosis **(D)** IL-6, **(E)** TIMP1 y **(F)** MMP2 se analizó mediante ELISA. La fluorescencia se normalizó al grupo de control sin estimulación. [Media ± SD, Dunnett] * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 o **** P < 0,0001.

Figura 23. Gráficas e imágenes que muestran el efecto de la neutralización de IL-11 en la producción de colágeno desencadenada por TGFβ1. Producción de colágeno por fibroblastos cardíacos con o sin estimulación con TGFβ1 y en presencia/ausencia de anticuerpo neutralizante anticuerpos anti-IL-11 o IgG de control de isotipo, determinada mediante **(A)** el ensayo Operetta o **(B)** tinción de rojo de Siria. [Media ± SD, Dunnett] * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 o **** P < 0,0001.

Figura 24. Gráficas que muestran la capacidad de diversos antagonistas de IL-11 e IL-11Rα para inhibir la fibrosis. Se trató a fibroblastos auriculares humanos con anticuerpo neutralizante contra IL-11, anticuerpo neutralizante contra IL-11Rα, molécula de receptor señuelo de IL-11 que se une a IL-11, ARNpi que regula negativamente la expresión de IL-11 o ARNpi que regula negativamente la expresión de IL-11RA y se analizó el efecto en la respuesta profibrótica impulsada por TGFβ1 en fibroblastos *in vitro*. [Media ± SD, Dunnett] * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 o **** P < 0,0001.

Figura 25. Diagramas de barras que muestran la respuesta de fibroblastos de ratones con supresión génica de IL-11-RA al tratamiento profibrótico. Los fibroblastos procedentes de ratones IL-11RA TS (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos nulos (-/-) se incubaron durante 24 h con TGFβ1, IL-11 o AngII (5 ng/ml). **(A)** Porcentaje de miofibroblastos determinado mediante el análisis de contenido de αSMA, **(B)** Porcentaje de células en proliferación determinado mediante tinción para EdU, **(C)** Contenido de colágeno y **(D)** Producción de MEC medida por la detección de periostina [Media ± SD].

5 **Figura 26.** Gráficas que muestran el efecto de la neutralización de IL-11 en la fibrosis en respuesta a diversos estímulos profibróticos. Los fibroblastos se cultivaron *in vitro* en presencia/ausencia de diversos factores profibróticos diferentes y en presencia/ausencia de anticuerpo neutralizante anti-IL-11 o anticuerpo anti-pantGFβ (A) Producción de colágeno y (B) generación de miofibroblastos determinada mediante análisis de la expresión de αSMA. [Media ± SD, Dunnett] * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 o **** P < 0,0001.

10 **Figura 27.** Diagramas de barras que muestran la expresión de marcadores de fibrosis en la aurícula y el corazón de animales TS e IL-11RA (-/-) después del tratamiento con AngII. (A) Contenido de colágeno, medido mediante ensayo de hidroxiprolina. (B) Expresión de colágeno (Col1A2). (C) Expresión de αSMA (ACTA2). (D) Expresión de fibronectina (Fn1).

15 **Figura 28.** Gráficas que muestran el efecto de la supresión génica de IL-11 RA en la fibrosis renal inducida por folato medida por el contenido de colágeno en tejido renal.

20 **Figura 29.** Esquema de los procedimientos experimentales para analizar la fibrosis en (A) pulmón, (B) piel y (C) ojo para ratones IL-11 RA -/- en comparación con ratones IL-11 RA +/-.

25 **Figura 30.** Gráficas de dispersión que muestran el múltiplo de cambio en la expresión génica. (A) Múltiplos de cambio en la expresión génica en fibroblastos después de la estimulación con TGFβ1, IL-11 o TGFβ1 e IL-11. (B) Múltiplos de cambio en la expresión génica en fibroblastos obtenidos de ratones IL-11RA+/+ e IL-11 RA-/- después de la estimulación con TGFβ1.

30 **Figura 31.** Fotografías que muestran el efecto de la supresión génica de IL-11RA en la curación de heridas y la fibrosis en el ojo después de una trabeculectomía (cirugía de filtración). (A) Secciones de ojos de animales IL-11RA+/+ (TS) e IL-11RA-/- (KO) 7 días después de la cirugía de filtración. (B) Maduración de las fibras de colágeno evaluada mediante la técnica de picro-rojo de Siria/luz de polarización (Szendrői et al. 1984, Acta Morphol Hung 32, 47-55); se observó más fibrosis en ratones TS que en ratones KO.

35 **Figura 32.** Gráficas que muestran el efecto de los receptores señuelo de IL-11 en la fibrosis en respuesta a la estimulación con TGFβ1. Se cultivaron fibroblastos *in vitro* en presencia/ausencia de TGFβ1 (5 ng/ml), en presencia o ausencia de (A) D11R1 (enlazador de 50aa de receptor señuelo) o (B) D11R2 (enlazador de 33aa de receptor señuelo), a diversas concentraciones diferentes. La generación de miofibroblastos tras 24 horas (es decir, el porcentaje de fibroblastos activados) se determinó mediante análisis de la expresión de αSMA.

40 **Figura 33.** Tabla que muestra la regulación de SNP de IL-11 VST_{estim} en *trans*.

Figura 34. Tabla que muestra la regulación de SNP de IL-11 VST_{estim} - VST_{noestim} en *cis*.

45 **Figura 35.** Tabla que muestra la regulación de SNP de IL-11 VST_{estim} - VST_{noestim} en *trans*.

50 **Figuras 36A, 36B, 36C y 36D.** Diagramas que muestran la regulación de la respuesta a IL-11 por SNP locales. Se secuenció el ARN de fibroblastos no estimulados y estimulados (TGFβ1, 5ng/ml, 24h) procedentes de 69 individuos genotipados. Las muestras se agruparon según el genotipo y se comparó el aumento en la expresión de IL-11 (VST_{estim}-VST_{noestim}) entre grupos con 0, 1 o 2 alelos menores.

55 **Figura 37.** Diagramas que muestran la regulación de la respuesta a IL-11 por SNP distantes. Se secuenció el ARN de fibroblastos no estimulados y estimulados (TGFβ1, 5ng/ml, 24h) procedentes de 69 individuos genotipados. Las muestras se agruparon según el genotipo y se comparó el aumento en la expresión de IL11 (VST_{estim}-VST_{noestim}) entre grupos con 0 o 1 alelos menores.

60 **Figuras 38A, 38B, 38C y 38D.** Gráficas que muestran que la IL-11 es necesaria para los efectos profibróticos de TGFβ1 en fibroblastos hepáticos. Activación y proliferación de fibroblastos hepáticos humanos primarios, con o sin estimulación con TGFβ1 y en presencia/ausencia de anticuerpo neutralizante anticuerpos anti-IL-11 o IgG de control de isotipo, medida mediante análisis de la proporción de (A) células positivas a α-SMA, (B) Células positivas a EdU, (C) Células positivas para colágeno y (D) Células positivas para periostina en comparación con las células no estimuladas (basal). [Media ± SD, Dunnett] * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 o **** P < 0,0001.

65 **Figura 39.** Diagrama de barras que demuestra que la IL-11 es necesaria para los efectos profibróticos de TGFβ1 en fibroblastos cutáneos. Activación de fibroblastos cutáneos de ratón, con o sin estimulación con TGFβ1 y en presencia/ausencia de anticuerpo neutralizante anticuerpos anti-IL-11, medida por el análisis del porcentaje de células positivas a α-SMA (fibroblastos activados).

Figura 40. Diagrama de barras que muestra la migración celular de fibroblastos pulmonares con y sin señalización de IL-11. La migración de fibroblastos pulmonares de animales IL-11RA+/+ (TS) e IL-11RA-/- (KO) se analizó en un ensayo de raspado *in vitro* sin estímulo o en presencia de TGFβ1 o IL-11.

Ejemplos**Ejemplo 1**

5 La respuesta fibrótica se caracteriza por cambios moleculares diseminados en los fibroblastos residentes activados. Para determinar el papel de la IL-11 como marcador clave de esta transición, los presentes inventores evaluaron y clasificaron las diferencias de expresión de ARN globales en fibroblastos auriculares procedentes de 80 individuos antes y 24 horas después de la activación con factor de crecimiento transformante beta-1 (TGFβ1). Los presentes inventores cultivaron fibroblastos primarios procedentes de la aurícula de 80 individuos que se sometieron a cirugía cardíaca para arteriopatía coronaria. Los fibroblastos se estudiaron *ex vivo* al comienzo del estudio y después de la estimulación con TGFβ1 (un potente estímulo profibrótico) usando elaboración de perfiles de expresión en todo el genoma (RNA-Seq) combinada con ensayos fenotípicos y genotipados.

15 La expresión de IL-11 estaba significativamente inducida en respuesta al tratamiento con TGFβ1 con niveles de ARN que aumentaron hasta 30x (> 8x de media). La expresión de IL-11 era mayor que la expresión de todos los demás genes individuales (figuras 1 a,b), lo que significa que de los ~11.500 genes expresados en los fibroblastos, IL-11 es el que se encuentra regulado positivamente de manera más notable. Esta regulación positiva de IL-11 se confirmó con experimentos de RT-qPCR así como de ELISA (figuras 1c,d), que indican que el aumento de la producción y liberación de proteína IL-11 en fibroblastos activados es uno de los principales impulsores de la fibrosis.

20 Para evaluar si IL-11 actúa como factor de señalización autocrino que impulsa la fibrosis, los presentes inventores incubaron fibroblastos auriculares no estimulados con IL-11 recombinante y monitorizaron la proliferación celular, la generación de miofibroblastos, así como la expresión de colágeno y periostina a nivel de proteína. Los presentes inventores observaron un aumento en la producción de colágeno, la proliferación celular y la expresión de periostina a niveles similares a los inducidos por la vía de señalización de TGFβ1. Los fibroblastos activados por IL-11 también se diferenciaron en miofibroblastos α-SMA+ (figura 2).

30 Además de su función profibrótica, también se observó que IL-11 desempeña un papel crítico en la respuesta fibrótica en sí inducida por TGFβ1. La inhibición de IL-11 con un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-IL-11 humana (IgG_{2A} monoclonal de ratón; clon n.º 22626; n.º de catálogo MAB218; R&D Systems, MN, EE. UU.) redujo la activación de fibroblastos mediante TGFβ1. Las células incubadas con TGFβ1 no generaron más proteínas de la matriz extracelular cuando estaba presente el anticuerpo anti-IL-11 (figura 3).

35 Los presentes inventores demostraron que los anticuerpos neutralizantes de IL-11 impiden la activación de fibroblastos inducida por TGFβ1.

Ejemplo 2

40 La inflamación y el daño tisular estimulan un proceso dinámico que implica el reclutamiento, la proliferación y la activación de fibroblastos para generar matriz extracelular e iniciar la curación de heridas y la cicatrización. Esta respuesta fibrótica se caracteriza por cambios moleculares diseminados en los fibroblastos residentes activados que pueden inducirse mediante TGFβ1, una citocina multifuncional que se libera por células locales e infiltrativas.

45 Para identificar marcadores clave de esta transición, los presentes inventores evaluaron y clasificaron diferencias de expresión de ARN globales mediante secuenciación de transcriptoma en fibroblastos auriculares procedentes de 80 individuos antes y 24 horas después del tratamiento con TGFβ1. Como se analiza en el ejemplo 1, la expresión de IL-11 estaba significativamente regulada positivamente en los fibroblastos activados y los presentes inventores demostraron por primera vez que la respuesta transcripcional de IL-11 es mayor que la respuesta transcripcional de todos los demás genes individuales regulados en la fibrosis (figura 4a). La comparación del nivel de expresión de IL-11 en el presente sistema modelo para diversos tejidos humanos indicó que los elevados niveles de IL-11 también eran muy específicos para la respuesta fibrótica (figura 4b), haciendo que sea un marcador ideal para evaluar el alcance de la fibrosis en el cuerpo humano.

55 Para evaluar además si IL-11 actúa como factor de señalización autocrino que impulsa la fibrosis, los presentes inventores confirmaron que una regulación positiva del ARN de IL-11 (figura 5a) da lugar a un aumento en la secreción de IL-11 (figura 5b) por fibroblastos auriculares. La incubación de fibroblastos con IL-11 no aumentó la expresión de ARN de IL-11 (figura 5c) pero ocasionó un aumento en la secreción de IL-11 por las células (figura 5d). Esto demuestra que IL-11 tiene un efecto autocrino en los fibroblastos que regula la producción de proteína IL-11 a nivel traduccional.

60 Después, los presentes inventores incubaron fibroblastos auriculares con TGFβ1, IL-11 recombinante o TGFβ1 y un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-IL-11 humana (IgG_{2A} monoclonal de ratón; clon n.º 22626; n.º de catálogo MAB218; R&D Systems, MN, EE. UU.) y controlaron la proliferación, la generación de miofibroblastos, así como la expresión de periostina a nivel de proteína. Los presentes inventores observaron un aumento en los fibroblastos activados (células positivas a αSMA), la producción de periostina y la proliferación celular a un nivel similar para fibroblastos estimulados tanto con TGFβ1 como con IL-11. Además de su función profibrótica, también se observó

65

que IL-11 desempeña un papel crítico en la fibrosis en sí por TGFβ1. El efecto profibrótico de TGFβ1 se inhibió cuando se neutralizó la IL-11 con el anticuerpo (figuras 6a-c). Se observó el mismo patrón cuando los presentes inventores monitorizaron la secreción de los marcadores de fibrosis, tales como IL6, MMP2 y TIMP1 (figuras 6d-f).

5 Después, los presentes inventores monitorizaron la deposición de colágeno, el distintivo patogenómico de la respuesta fibrótica, usando una serie de ensayos a lo largo de varios niveles de regulación de la expresión génica. Se observó que TGFβ1 aumenta el colágeno intracelular (figura 7a), el colágeno secretado (figura 7b), así como los niveles de ARN de colágeno (figura 7c), tal como se esperaba. Solo se observó respuesta a la IL-11 a nivel de proteína (figura 7a,b) y no a nivel de ARN (figura 7c). La estimulación con TGFβ1 en paralelo a la inhibición de IL-11
10 dio lugar a un aumento en el ARN de colágeno, pero este efecto impulsado por TGFβ1 no se tradujo a nivel de proteína.

Para determinar adicionalmente el papel central de la IL-11 en la fibrosis aguas debajo de los múltiples estímulos profibróticos, los presentes inventores evaluaron la expresión de IL-11 entre poblaciones de fibroblastos procedentes de diferentes tejidos en respuesta a TGFβ1 (figura 8a), ET-1, (figura 8b) y PDGF (figura 8c). Los presentes inventores también administraron IL-11 recombinante de manera sistémica a ratones C57BL/6 y monitorizaron la expresión de colágeno y αSMA. La producción de colágeno se aumentó en el riñón, el corazón y el hígado (figura 8d) y también se detectaron fibroblastos más activados en el corazón y el riñón, lo que se indica por mayores niveles de proteína αSMA (figura 8e).
15

Los presentes hallazgos demuestran un papel novedoso y central para la IL-11 en la fibrosis y, de manera más importante, demuestran que la IL-11 se encuentra aguas debajo de los estímulos profibróticos clave ente diversos tejidos. Estos resultados demuestran que la IL-11 es necesaria para que TGFβ1 pase de la regulación transcripcional a la traducción en proteínas. La inhibición de IL-11 detiene el efecto profibrótico de TGFβ1 en el transcriptoma (figura 9).
20
25

Ejemplo 3: Anticuerpos anti-IL-11 para inhibir estímulos profibróticos

En experimentos similares a los descritos respecto de la figura 3c, se expuso a fibroblastos auriculares a otros estímulos profibróticos en forma de angiotensina II (ANG 2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y endotelina 1 (ET-1) y se midió la producción de colágeno.
30

Además de la inducción de la expresión de ARNm de IL-11, cada uno de ANG2, PDGF y ET-1 indujo la expresión de proteína IL-11. La inhibición de IL-11 con un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-IL-11 humana (IgG_{2A} monoclonal de ratón; clon n.º 22626; n.º de catálogo MAB218; R&D Systems, MN, EE. UU.) bloqueó el efecto profibrótico de cada uno de estos estímulos profibróticos (figura 10), lo que indica que la IL-11 es el efector central de los principales estímulos profibróticos (TGFβ1, ANG2, PDGF y ET-1).
35

Ejemplo 4: Silenciamiento génico de IL-11 R

Se transfectó a células HEK (24h) con ARNpi no diana (NT) o uno de los cuatro ARNpi diferentes contra el receptor IL11RA1 (ARNpi 5-8; figura 14; SEQ ID NO: 15 a 18). El ARN se extrajo y se ensayó respecto de la expresión de ARNm de IL11RA1 mediante qPCR. Los datos se muestran en la figura 15 como niveles de expresión de ARNm en relación con el control (NT).
40
45

Ejemplo 5: Papel de IL-11 en la fibrosis

5.1 IL-11 se encuentra desregulada en la fibrosis

Para comprender los procesos moleculares subyacentes a la transición de fibroblastos a miofibroblastos activados, se obtuvo tejido auricular de más de 200 pacientes que se habían sometido a una cirugía de derivación cardíaca en el National Heart Centre Singapore. Las células se cultivaron *in vitro* hasta un pase bajo (pase <4) y o no se estimularon o se estimularon con TGFβ1 durante 24h. Posteriormente, los presentes inventores llevaron a cabo un análisis de secuenciación de ARN de alto rendimiento (RNA-Seq) de los fibroblastos no estimulados y las células estimuladas con el estímulo profibrótico prototípico, TGFβ1 en 160 individuos; la profundidad media de lectura fue de ~70M lecturas por muestra (100pb de extremo emparejado; figura 16).
50
55

Para asegurar la pureza de los cultivos celulares de fibroblastos auriculares, los presentes inventores analizaron la expresión de genes marcadores de tipo celular de células endoteliales, cardiomiocitos y fibroblastos procedentes de la aurícula (Hsu et al., 2012 Circulation Cardiovasc Genetics 5, 327-335) en el conjunto de datos de RNA-seq.
60

Los resultados se muestran en las figuras 17A a 17E y confirman la pureza de los cultivos de fibroblastos auriculares.

65 La expresión génica se evaluó mediante RNA-seq del tejido de origen (muestras de tejidos auriculares humanos, n=8) y cultivos de fibroblastos primarios no estimulados. Se detectó una expresión nula/muy baja del marcador de

células endoteliales PECAM1 (figura 17A) y de los marcadores de cardiomiocitos MYH6 (figura 17B) y TNNT2 (figura 17C) en las muestras de cultivo celular de fibroblastos.

5 Los marcadores para fibroblastos COL1A2 (figura 17D) y ACTA2 (figura 17E) estaban altamente expresados en comparación con el tejido de origen.

10 A continuación, se analizaron los datos de RNA-Seq para identificar genes cuya expresión estaba aumentada o reducida tras la estimulación con TGFβ1 y esta información se integró con el gran conjunto de datos de RNA-Seq entre los más de 35 tejidos humanos proporcionados por el proyecto GTEx (The GTEx Consortium, 2015 Science 348, 648-660). Esto permitió identificar las firmas de expresión génica que eran específicas para la transición fibroblasto-miofibroblasto.

15 Los resultados se muestran en las figuras 18A a 18E. Entre los más de 10000 genes expresados en los fibroblastos, IL-11 era el gen más fuertemente regulado positivamente en respuesta a la estimulación con TGFβ1 y de media, entre todos los 160 individuos, estaba regulado positivamente más de 10 veces (figura 18A).

20 La regulación positiva de la expresión de IL-11 se confirmó mediante análisis ELISA del sobrenadante de cultivo celular de fibroblastos estimulados con TGFβ1 (figura 18C). En comparación con el nivel de expresión de IL-11 en otros tejidos de individuos sanos, se observó que esta respuesta era altamente específica para los fibroblastos activados (figura 18D). También se confirmaron diversos múltiplos de cambio de la expresión de ARN de IL-11 mediante análisis por qPCR (figura 18E).

25 A continuación, se cultivaron fibroblastos *in vitro* y se estimularon con varios factores profibróticos conocidos diferentes: ET-1, ANGII, PDGF, OSM e IL-13 y también con IL-11 humana recombinante. Para analizar la regulación positiva de IL-11 producida en respuesta a la estimulación con IL-11, se confirmó que el ELISA solo era capaz de detectar IL-11 nativa secretada por células y no detecta la IL-11 recombinante usada para las estimulaciones (figura 19B).

30 Los resultados se muestran en la figura 19A. Se observó que cada factor inducía de manera significativa la secreción de IL-11 por parte de fibroblastos. Se demostró que la IL-11 actúa en un bucle autocrino en los fibroblastos, que puede dar como resultado una regulación positiva de la proteína IL-11 de hasta 100 veces tras 72 horas (figura 19D).

35 Curiosamente, este bucle autocrino para IL-11 es similar a la producción autocrina de IL-6. La IL-6 es de la misma familia de citocinas y también señala a través del receptor gp130 (Garbers y Scheller, 2013 Biol Chem 394, 1145-1161), que se ha propuesto que asegura la supervivencia continuada y el crecimiento de células de cáncer de pulmón y mama (Grivennikov y Karin, 2008 Cancer Cell 13, 7-9).

40 No se detectaron aumentos en el nivel de ARN de IL-11 en respuesta a la estimulación con IL-11 (figura 19D). A diferencia de TGFβ1, que aumenta la expresión de IL-11 a nivel tanto de ARN como de proteína, parece ser que, por lo tanto, IL-11 regula positivamente la expresión de IL-11 únicamente a nivel postranscripcional.

5.2 IL-11 tiene un papel profibrótico en la fibrosis del tejido cardíaco

45 Para explorar si la producción autocrina de IL-11 es pro o antifibrótica, se cultivaron fibroblastos *in vitro* con IL-11 recombinante y se analizó la fracción de miofibroblastos (células positivas a αSMA) y la producción de matriz extracelular.

50 La expresión de αSMA, colágeno y periostina se monitorizó con el sistema para obtención de imágenes de alto contenido Operetta de un modo automatizado, de alto rendimiento. En paralelo, se analizó la secreción de proteínas marcadoras de fibrosis, tales como MMP2, TIMP1 e IL-6 mediante ensayos ELISA y se confirmaron los niveles de colágeno mediante análisis colorimétrico de rojo de Siria del sobrenadante de cultivo celular.

55 Brevemente, se incubaron fibroblastos auriculares de 3 individuos en 2 pocillos cada uno durante 24 h sin estimulación, con TGFβ1 (5 ng/ml) o con IL-11 (5 ng/ml). Después de la incubación, se tiñeron las células para analizar el contenido de α-SMA para estimar la fracción de miofibroblastos y para colágeno y periostina para estimar la producción de MEC. La fluorescencia se midió en 7 campos por pocillo. También se evaluó el contenido de colágeno mediante tinción con rojo de Siria de 2 pocillos por individuo. La señal se normalizó al grupo de control sin estimulación. La secreción de los marcadores de fibrosis IL-6, TIMP1 y MMP2 se analizó mediante ELISA.

60 Los resultados se muestran en las figuras 20A a 20F. TGFβ1 activó a los fibroblastos y aumentó la producción de MEC (figura 20A). De manera inesperada y a diferencia del papel antifibrótico descrito para IL-11 en el tejido cardíaco en la bibliografía científica, la IL-11 recombinante provocó un aumento en la fracción de miofibroblastos en los cultivos de fibroblastos y también promovió la producción de las proteínas de la matriz extracelular, colágeno y periostina, en la misma medida que TGFβ1 (figura 20A). Las citocinas tanto IL-11 como TGFβ1 también aumentaron significativamente la secreción de los marcadores profibróticos, IL-6, TIMP1 y MMP2 (figuras 20B a 20E) y a un nivel similar.

Los inventores consideran que la contradicción entre el presente hallazgo de que IL-11 es profibrótica en el tejido cardíaco y el papel antifibrótico descrito en la bibliografía podría estar relacionado con el uso de IL-11 humana en roedores en estos estudios anteriores (Obana et al., 2010, 2012; Stangou et al., 2011; Trepicchio y Dorner, 1998).

- 5 Para investigar esta hipótesis, se llevaron a cabo diluciones seriadas de IL-11 humana y de ratón y se monitorizó la activación de fibroblastos auriculares humanos (figura 20F). No se observó activación de fibroblastos a bajas concentraciones de IL-11 humana en células de ratón, lo que sugiere que los hallazgos previos acerca de la función de IL-11 pueden deberse, en parte, a observaciones no específicas para IL-11.

10 5.3 IL-11 tiene un papel profibrótico en la fibrosis de una serie de tejidos

Para comprobar si la acción profibrótica de IL-11 era específica para fibroblastos auriculares, se cultivaron *in vitro* fibroblastos humanos procedentes de varios tejidos diferentes (corazón, pulmón, piel, riñón e hígado), estimulados con IL-11 humana y se analizó la activación de fibroblastos y la producción de MEC como se ha descrito anteriormente. Se observó una mayor activación de fibroblastos y producción de MEC, en comparación con los cultivos no estimulados en fibroblastos procedentes de cada uno de los tejidos analizados.

15 5.3.1 Fibrosis hepática

20 Para comprobar si la señalización de IL-11 es importante en la fibrosis hepática, se cultivaron fibroblastos hepáticos primarios humanos (Cell Biologics, n.º de cat. H-6019) hasta un pase bajo en los pocillos de placas de 96 pocillos y o bien no se estimularon, o se estimularon con TGFβ1 (5ng/ml, 24h), IL-11 (5 ng/ml, 24h) o se incubaron tanto con TGFβ1 (5 ng/ml) como con anticuerpo neutralizante anti-IL-11 (2 µg/ml) o TGFβ1 (5 ng/ml) y un anticuerpo de control de isotipo. La activación de fibroblastos (células positivas a αSMA), la proliferación celular (células positivas a EdU) y la producción de MEC (perioistina y colágeno) se analizaron usando la plataforma Operetta.

25 Los resultados de los experimentos con fibroblastos hepáticos primarios humanos se muestran en las figuras 38A a 38D. Se observó que IL-11 activaba los fibroblastos hepáticos y se observó que la señalización de IL-11 era necesaria para la acción profibrótica de TGFβ1 en fibroblastos hepáticos. Tanto la activación como la proliferación de fibroblastos se inhibió mediante el anticuerpo neutralizante anti-IL-11.

30 5.3.2 Fibrosis cutánea

Para comprobar si la señalización de IL-11 es importante en la fibrosis cutánea, se cultivaron fibroblastos cutáneos primarios de ratón hasta un pase bajo en los pocillos de placas de 96 pocillos y o bien no se estimularon, o se estimularon con TGFβ1 (5ng/ml, 24h) o se incubaron durante 24 h tanto con TGFβ1 (5 ng/ml) como con anticuerpo neutralizante anti-IL-11 (2 µg/ml). Después, se analizó usando la plataforma Operetta la activación de fibroblastos (células positivas a αSMA).

40 En la figura 39 se muestran los resultados. La activación de fibroblastos cutáneos mediada por TGFβ1 se inhibió mediante el anticuerpo neutralizante anti-IL-11.

5.3.3 Fibrosis en múltiples órganos

45 A continuación, se inyectó IL-11 recombinante de ratón (100 µg/kg, 3 días/semana, 28 días) en ratones para comprobar si la IL-11 puede impulsar la fibrosis tisular global *in vivo*.

50 En la figura 21 se muestran los resultados. En comparación con la inyección de AngII (una citocina que provoca una elevación en la presión sanguínea e hipertrofia cardíaca), IL-11 también aumentó el peso del corazón, pero también el peso del riñón, el pulmón y el hígado, indexado al peso corporal (figura 21B). La evaluación del contenido de colágeno en estos tejidos mediante ensayo de hidroxiprolina reveló una regulación positiva de la producción de colágeno en estos tejidos, lo que indica que la fibrosis es la causa probable para el aumento en el peso del órgano (figura 6C). La expresión de los genes marcadores de fibrosis ACTA2 (= αSMA), Col1a1, Col3a1, Fn1, Mmp2 y Timp1 también se detectó mediante análisis qPCR del ARN aislado de tejidos del corazón, el riñón, el pulmón y el hígado de estos animales.

Ejemplo 6: Potencial terapéutico del antagonismo de IL-11/IL-11R

6.1 Inhibición de la respuesta fibrótica usando antagonistas neutralizantes de IL-11/IL-11R

60 A continuación, se investigó si el bucle autocrino de secreción de IL-11 era necesario para el efecto profibrótico de TGFβ1 en fibroblastos.

65 Se inhibió IL-11 usando un anticuerpo neutralizante disponible comercialmente (IgG_{2A} monoclonal de ratón; clon n.º 22626; n.º de catálogo MAB218; R&D Systems, MN, EE. UU.). Los fibroblastos se trataron con TGFβ1 en presencia o ausencia del anticuerpo y se midieron la activación de fibroblastos, la proporción de células en proliferación y la

producción de MEC y marcadores de la respuesta fibrótica.

Brevemente, se incubaron fibroblastos auriculares procedentes de 3 individuos durante 24 h con TGFβ1 (5 ng/ml) o TGFβ1 en presencia de anticuerpo neutralizante anti-IL-11 o de anticuerpo de control de isotipo. Después de la incubación, se tiñeron las células para αSMA para determinar la fracción de miofibroblastos, se determinó la proporción de células en proliferación analizando las células para la incorporación de EdU y se midió la periostina para determinar la producción de MEC. La fluorescencia se midió con la plataforma Operetta para 14 campos a lo largo de 2 pocillos para cada individuo. La secreción de los marcadores de fibrosis IL-6, TIMP1 y MMP2 también se analizó mediante ELISA. La fluorescencia se normalizó al grupo de control sin estimulación.

Los resultados se muestran en las figuras 22A a 22F. Se observó que la inhibición de IL-11 mejoraba la fibrosis inducida por TGFβ1 y se demostró que la IL-11 es esencial para el efecto profibrótico de TGFβ1. Se observó que la inhibición de IL-11 "rescataba" el fenotipo de TGFβ1 a nivel de proteína.

También se analizó la producción de colágeno. Se incubaron fibroblastos cardíacos procedentes de 3 individuos durante 24 h con TGFβ1 (5 ng/ml) o TGFβ1 y un anticuerpo neutralizante de IL-11. Después de la incubación, se tiñeron las células para colágeno usando el ensayo Operetta y se cuantificó la fluorescencia como se ha descrito anteriormente. Los niveles de colágeno secretados en el sobrenadante de cultivo celular se evaluaron mediante tinción de rojo de Siria.

Los resultados se muestran en las figuras 23A y 23B y confirman el efecto antifibrótico de la inhibición de IL-11 usando un anticuerpo neutralizante.

A continuación, se analizó la capacidad de varios otros antagonistas de IL-11/IL-11R para inhibir la fibrosis *in vitro* usando el ensayo de transición de fibroblasto auricular a miofibroblasto inducida por TGFβ1 descrito anteriormente en el presente documento.

Brevemente, se cultivaron células de fibroblastos auriculares humanos *in vitro*, se estimularon durante 24 h con TGFβ1 (5 ng/ml) o se dejaron sin estimular, en presencia/ausencia de: (i) anticuerpo neutralizante anti-IL-11, (ii) una proteína de fusión IL-11 RA-gp130 (iii) anticuerpo neutralizante anti-IL-11RA, (iv) tratamiento con ARNpi dirigido contra IL-11 o (v) tratamiento con ARNpi dirigido contra IL-11RA. Se analizó la proporción de fibroblastos activados (miofibroblastos) evaluando el contenido de αSMA como se ha descrito anteriormente.

En la figura 24 se muestran los resultados. Se observó que la señalización de cada uno de los antagonistas de IL-11/IL-11R era capaz de suprimir la respuesta profibrótica mediada por TGFβ1.

Ejemplo 7: Confirmación *in vivo* del papel profibrótico para la señalización de IL-11/IL-11R

7.1 Estudios *in vitro* usando células procedentes de ratones con supresión génica del gen de IL-11RA

Todos los ratones fueron criados y alojado en la misma sala y se les proporcionó comida y agua a voluntad. Los ratones que carecían de alelos funcionales para IL-11Rα (ratones IL-11RA1 KO) tenían un acervo genético de C57Bl/6. Los ratones tenían 9-11 semanas de edad y el peso de los ratones no difirió de manera significativa.

Para confirmar adicionalmente el efecto antifibrótico de la inhibición de la señalización de IL-11/IL-11R, se generaron fibroblastos primarios de los ratones con supresión génica del gen IL-11 RA y se incubaron con células de fibroblastos primarios recogidas de animales IL-11RA+/+ (es decir, de tipo silvestre), IL-11RA+/- (es decir, supresión génica heterocigótica) e IL-11 RA-/- (es decir, supresión génica homocigótica) con TGFβ1, IL-11 o AngII. Se analizó la activación y proliferación de fibroblastos y la producción de MEC.

Los fibroblastos procedentes de ratones IL-11RA+/+, IL-11RA+/- e IL-11 RA-/- se incubaron durante 24 horas con TGFβ1, IL-11 o AngII (5 ng/ml). Después de la incubación, se tiñeron las células para el contenido de αSMA para estimar la fracción de miofibroblastos, para EdU para identificar la fracción de células en proliferación y para colágeno y periostina para estimar la producción de MEC. La fluorescencia se midió usando la plataforma Operetta.

Los resultados se muestran en las figuras 25A a 25D. Se observó que los ratones IL-11 RA-/- no respondían a los estímulos profibróticos. Estos resultados sugieren que la señalización de IL-11 también es necesaria para la fibrosis inducida por AngII.

A continuación, se investigó si esto también era cierto para otras citocinas profibróticas. Brevemente, se cultivaron fibroblastos *in vitro* en presencia/ausencia de varios factores profibróticos diferentes (ANG2, ET-1 o PDGF) y en presencia/ausencia de anticuerpo neutralizante anti-IL-11 o anticuerpo anti-pan-TGFβ. Después de 24 horas, se determinó la producción de colágeno por las células mediante análisis usando el sistema Operetta como se ha descrito anteriormente y se determinó la generación de miofibroblastos mediante análisis de la expresión de αSMA como se ha descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en las figuras 26A y 26B. Se observó que IL-11 era necesaria para la fibrosis aguda debajo de diversos estímulos profibróticos y por lo tanto, se identificó como un mediador central de la fibrosis inducida por una serie de factores profibróticos diferentes.

5 En un experimento adicional, se investigó el papel de la señalización de IL-11 en la fibrosis pulmonar, usando un ensayo de raspado *in vitro* de migración de fibroblastos pulmonares. En respuesta a estímulos profibróticos, los fibroblastos se activan y migran dentro del nicho fibrótico en el organismo. La velocidad de migración de las células es una medida de las interacciones entre células y entre células y la matriz y un modelo para curación de heridas *in vivo* (Liang et al., 2007; Nat Protoc. 2(2):329-33).

10 Se cultivaron fibroblastos procedentes de tejido pulmonar de ratones tanto de tipo silvestre (TS) como homocigóticos para la supresión génica IL-11RA (-/-) hasta un pase bajo sobre una superficie de plástico, hasta que formaron una monocapa de células uniforme. Después, se creó un raspado en la capa celular y se monitorizó la migración celular próxima al raspado, ya sea en ausencia de estimulación o en presencia de TGFβ1 o IL-11. Las imágenes capturadas en los dos instantes de tiempo de inmediatamente después de crear la raspadura y a las 24 h para determinar el área cubierta por células y se comparó la velocidad de migración entre fibroblastos TS y KO. La migración celular (área en la raspadura cubierta por células tras 24h) se normalizó a la velocidad de migración de células TS sin estímulo.

15 En la figura 40 se muestran los resultados. Se observó que los fibroblastos procedentes de ratones TS migraban más rápido en presencia de TGFβ1 e IL-11, lo que indica un efecto profibrótico de ambas citocinas en los fibroblastos de pulmón. Las células que carecían de señalización de IL-11 procedentes de ratones KO migraron más lentamente en comparación con las células TS. Tampoco migraron más rápido en presencia de TGFβ1. El ensayo de raspado reveló que los fibroblastos de pulmón que carecían de señalización de IL-11 tenían una velocidad de migración celular reducida tanto en presencia de TGFβ1 o de IL-11 y al comienzo del estudio. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de IL-11 es antifibrótica en el pulmón.

7.2 Fibrosis cardíaca

30 Se investigó la eficacia de la inhibición de IL-11 para tratar trastornos fibróticos *in vivo*. Se usó un modelo de ratón para fibrosis cardíaca en el que la fibrosis se induce por tratamiento con AngII para investigar si los ratones IL-11 RA -/- estaban protegidos contra la fibrosis cardíaca.

35 Brevemente, se implantó una bomba y se trató a ratones de tipo silvestre (TS) IL-11RA(+/+) y con supresión génica (KO) de IL-11 RA(-/-) con AngII (2mg/kg/día) durante 28 días. Al final del experimento, se evaluó el contenido de colágeno en las aurículas de los ratones usando un kit de ensayo colorimétrico a base de hidroxiprolina y se analizó mediante qPCR el nivel de expresión de ARN de los marcadores de fibrosis Col1A2, αSMA (ACTA2) y fibronectina (Fn1).

40 Los resultados se muestran en las figuras 27A a 27D. Se observó que los ratones IL-11RA-/- estaban protegidos frente a los efectos profibróticos de AngII.

7.3 Fibrosis renal

45 Se estableció un modelo de ratón para fibrosis renal en ratones de tipo silvestre (TS) IL-11RA(+/+) y con supresión génica (KO) de IL-11 RA(-/-) mediante inyección intraperitoneal de ácido fólico (180mg/kg) en vehículo (NaHCO₃ 0,3M); a los ratones de control solo se les administró vehículo. Se extrajeron los riñones 28 días después de la inyección, se pesaron y o bien se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 % para tinción con tricromo de Masson y rojo de Siria o se congelaron inmediatamente para el ensayo de colágeno, ARN y estudios de proteínas.

50 El ARN total se extrajo del riñón congelado instantáneamente usando reactivo Trizol (Invitrogen) y el método TissueLyzer de Qiagen, seguido de purificación en columna RNeasy (Qiagen). El ADNc se preparó usando el kit para síntesis de ADNc iScript™, en el que cada reacción contenía 1 µg de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo en muestras triplicadas con la tecnología TaqMan (Applied Biosystems) o Fast SYBR Green (Qiagen) usando StepOnePlus™ (Applied Biosystems) durante 40 ciclos. Los datos de expresión se normalizaron al nivel de expresión de ARNm de GAPDH y los presentes inventores usaron el método de 2-ΔΔCt para calcular el múltiplo de cambio. Se sometió a los riñones congelados de manera instantánea a hidrólisis ácida por calentamiento en HCl 6M a una concentración de 50 mg/ml (95 °C, 20 horas). Se cuantificó la cantidad de colágeno total en el hidrolizado basándose en la detección colorimétrica de la hidroxiprolina usando el kit de ensayo para colágeno total Quickzyme (Quickzyme Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

65 Los resultados del análisis se muestran en la figura 28. Se demostró que la fibrosis renal inducida por folato es dependiente de la señalización mediada por IL-11. Se observó un aumento significativo en el contenido de colágeno en tejido renal en ratones IL-11RA+/+, indicativo de fibrosis renal. No se observó un aumento significativo en el contenido de colágeno en tejido renal en ratones IL-11RA-/. Los animales deficientes para la señalización de IL-11

tenían una deposición de colágeno significativamente menor en los riñones tras una lesión tóxica, en comparación con los animales de tipo silvestre.

7.4 Fibrosis pulmonar

5 La IL-11 se confirma como un mediador clave de la fibrosis en el pulmón, la piel y el ojo en modelos *in vivo* adicionales usando los ratones con supresión génica de IL-11 RA $-/-$. Se muestran esquemas de los experimentos en las figuras 29A a 29C.

10 Para analizar la fibrosis pulmonar, se trató a ratones IL-11RA $-/-$ y a ratones IL-11RA $+/+$ con administración intratraqueal de bleomicina en el día 0 para establecer una respuesta fibrótica en el pulmón (fibrosis pulmonar). La fibrosis del pulmón se desarrolló a los 21 días, punto en el que se sacrificó a los animales y se analizaron las diferencias en los marcadores de fibrosis entre animales con y sin señalización de IL-11. Los ratones IL-11RA $-/-$ tienen una respuesta fibrótica reducida en el tejido pulmonar en comparación con los ratones IL-11RA $+/+$, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

7.5 Fibrosis cutánea

20 Para analizar la fibrosis de la piel, se trató a ratones IL-11 RA $-/-$ y a ratones IL-11RA $+/+$ con administración subcutánea de bleomicina en el día 0 para establecer una respuesta fibrótica en la piel. La fibrosis de la piel se desarrolló a los 28 días, punto en el que se sacrificó a los animales y se analizaron las diferencias en los marcadores de fibrosis entre animales con y sin señalización de IL-11. Los ratones IL-11 RA $-/-$ tienen una respuesta fibrótica reducida en el tejido cutáneo en comparación con los ratones IL-11 RA $+/+$, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

25

7.6 Fibrosis ocular

30 Para analizar la fibrosis en el ojo, se sometió a una trabeculectomía a ratones IL-11RA $-/-$ y a ratones IL-11RA $+/+$ en el día 0 para iniciar una respuesta de curación de heridas en el ojo. La fibrosis del ojo se desarrolló en 7 días. Se midió la respuesta fibrótica y se comparó entre los ratones IL-11 RA $-/-$ y los ratones IL-11RA $+/+$. Los ratones IL-11RA $-/-$ tienen una respuesta fibrótica reducida en el tejido ocular en comparación con los ratones IL-11 RA $+/+$, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

7.7 Otros tejidos

35 También se analizó el efecto de la supresión génica de IL-11RA en modelos de ratón de fibrosis para otros tejidos, tales como el hígado, el intestino y también se analizó en un modelo relevante para fibrosis multiorgánica (es decir, sistémica). Se midió la respuesta fibrótica y se comparó entre los ratones IL-11 RA $-/-$ y los ratones IL-11RA $+/+$. Los ratones IL-11RA $-/-$ tienen una respuesta fibrótica reducida en comparación con los ratones IL-11 RA $+/+$, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

40

Ejemplo 8: Análisis de los mecanismos moleculares subyacentes a la inducción de la fibrosis mediada por IL-11

45 Se cree que el modo de acción canónico de la IL-11 es la regulación de la expresión de ARN por medio de la transcripción mediada por STAT3 (Zhu et al., 2015 PLoS ONE 10, e0126296), y también a través de la activación de ERK.

50 Se observa activación de STAT3 tras la estimulación con IL-11. Sin embargo, cuando se incuban fibroblastos con TGF β 1, solo se observa la activación de la vía canónica de SMAD y las vías de ERK y no se observa activación de STAT3, incluso a pesar del hecho de que IL-11 se secreta en respuesta a TGF β 1. Únicamente la activación de ERK es común para la transducción de señales tanto de TGF β 1 como de IL-11.

55 Se ha descrito previamente la comunicación cruzada de la señalización de TGF β 1 e IL-6, en donde TGF β 1 bloquea la activación de STAT3 por parte de IL-6 (Walia et al., 2003 FASEB J. 17, 2130-2132). Dada la estrecha relación entre IL-6 e IL-11, puede observarse una comunicación cruzada similar para la señalización mediada por IL-11.

60 Los inventores investigaron mediante análisis RNA-Seq si la regulación de la abundancia de ARN era el mecanismo subyacente para el aumento de la expresión de proteínas marcadoras de fibrosis en respuesta a la IL-11, lo que podría sugerir que STAT3 sea la vía de señalización subyacente para los procesos profibróticos mediados por IL-11. Se incubaron fibroblastos durante 24 h ya sea sin estímulos o en presencia de TGF β 1, IL-11 o TGF β 1 e IL-11.

65 Los resultados se muestran en la figura 30A. TGF β 1 indujo la expresión de colágeno, ACTA2 (α SMA) y otros marcadores de fibrosis a nivel de ARN. Sin embargo, IL-11 no reguló la expresión de estos genes, sino un conjunto de genes distinto.

El análisis de ontología génica sugiere que un efecto profibrótico en los fibroblastos está impulsado por la expresión de ARN regulada por IL-11. Tanto TGFβ1 como IL-11 regulan un conjunto prácticamente distinto de genes a nivel de ARN.

- 5 Mientras que TGFβ1 aumenta la secreción de IL-11, los genes diana de IL-11 no se regulan cuando están presentes tanto TGFβ1 como IL-11. Esto sugiere que TGFβ1 regula positivamente a IL-11 y simultáneamente, bloquea la regulación canónica impulsada por IL-11 de la expresión de ARN mediante STAT3, similar a lo que se conoce acerca de la interacción de las vías de TGFβ1 e IL-6 (Walia et al., 2003 FASEB J. 17, 2130-2132).
- 10 También se analizó si las diferencias de expresión de ARN inducidas por TGFβ1 eran dependientes de la señalización de IL-11, analizando los cambios en la expresión de ARN en fibroblastos obtenidos de ratones IL-11RA -/- en comparación con ratones IL-11RA +/+. La expresión de ARN regulada por TGFβ1 se siguió observando cuando se estimularon células con supresión génica de IL-11 RA con TGFβ1 y los niveles de ARN de αSMA, colágeno etc. seguían regulados positivamente en ausencia de señalización de IL-11 (en fibroblastos IL-11 RA -/-).
- 15 Cuando se investigó el efecto profibrótico de IL-11 y el efecto antifibrótico de la inhibición de IL-11 *in vitro*, solo se observó una expresión reducida de marcadores de fibrosis a nivel de proteína, no a nivel transcripcional, como se determinó mediante qPCR.

20 Se sabe que la activación de vías no canónicas (por ejemplo, transducción de señales de ERK) es crucial para la acción profibrótica de TGFβ1 (Guo y Wang, 2008 Cell Res 19, 71-88). Es probable que las vías no canónicas sean importantes para la señalización para todas las citocinas profibróticas y que la IL-11 es un regulador postranscripcional que es esencial para la fibrosis.

Ejemplo 9: Anticuerpos humanos anti-IL-11 humana

- 25 Se desarrollaron anticuerpos completamente humanos anti-IL-11 humana mediante presentación en fagos.
- 30 Se obtuvo IL-11 humana recombinante (n.º de cat. Z03108-1) e IL-11 murina recombinante (n.º de cat. Z03052-1) de GenScript (NJ, EE. UU.). La IL-11 recombinante humana se expresó en células CHO, tanto en forma de una versión marcada con Fc como en forma de una versión sin marcador. La IL-11 murina sin marcador se expresó en células HEK293.
- 35 Se confirmó la actividad biológica de IL-11 de la IL-11 humana y la IL-11 de ratón recombinantes mediante análisis *in vitro* usando cultivos celulares de fibroblastos primarios.
- También se prepararon IL-11 humana e IL-11 murina recombinantes biotiniladas mediante biotinilación de las moléculas de IL-11 humana e IL-11 murina recombinantes, según métodos convencionales.
- 40 Se identificaron anticuerpos capaces de unirse tanto a IL-11 humana como a IL-11 murina (es decir, anticuerpos con reactividad cruzada) mediante presentación en fagos usando una biblioteca nativa humana mediante paneo usando IL-11 humana y murina recombinante no biotinilada, basándose en 16 estrategias de paneo diferentes.
- 45 La presentación en fagos identificó 175 moléculas de unión de scFv, como "primeros aciertos". El análisis de secuencia de las secuencias de CD de estos 175 scFv identificó 86 scFv únicos.
- 50 Los scFv solubles se produjeron mediante expresión recombinante en *E. coli* y se analizó su capacidad para unirse a IL-11 humana e IL-11 murina mediante ELISA. Brevemente, se recubrieron los pocillos de una placa de ELISA con los antígenos respectivos, se añadió el sobrenadante de cultivo celular que contenía los scFv respectivos a una dilución 1:2 y se detectó la unión.
- 55 Los resultados del análisis ELISA revelaron:
- 8 scFv capaces de unirse únicamente a IL-11 humana;
 - 6 scFv capaces de unirse únicamente a IL-11 murina;
 - 32 scFv que mostraban una unión tan solo débil a IL-11 humana/murina, con una relación de señal a ruido elevada, y;
 - 40 scFv que tenían reactividad cruzada tanto con IL-11 humana como con IL-11 murina.
- 60 De estos 86 scFv, se seleccionaron 56 candidatos para su caracterización funcional adicional. Para los análisis adicionales, los scFv se clonaron en formato scFv-Fc en *E. coli*.
- 65 Las secuencias de VH y VL de los anticuerpos se clonaron en vectores de expresión para la generación de anticuerpos scFv-Fc (IgG1 humana). Los vectores se expresaron de manera transitoria en células de mamífero cultivadas en medio asérico y se aislaron mediante purificación con proteína A.

Ejemplo 10: Caracterización funcional de anticuerpos humanos anti-IL-11 humana

Se analizaron los anticuerpos descritos en el ejemplo 9 en ensayos *in vitro* para determinar su capacidad para (i) inhibir la señalización mediada por IL-11 humana y (ii) inhibir la señalización mediada por IL-11 de ratón. También se analizó mediante ELISA la afinidad de los anticuerpos por IL-11 humana.

10.1 Capacidad para inhibir la señalización mediada por IL-11 humana

Para investigar la capacidad para neutralizar la señalización mediada por IL-11 humana, se cultivaron fibroblastos auriculares cardíacos humanos en los pocillos de placas de 96 pocillos en presencia de TGFβ1 (5 ng/ml) durante 24 horas, en presencia o ausencia de los anticuerpos anti-IL-11. TGFβ1 promueve la expresión de IL-11, que a su vez, impulsa la transición de los fibroblastos quiescentes a fibroblastos activados, positivos para αSMA. Se ha demostrado previamente que la neutralización de IL-11 previene la transición inducida por TGFβ1 a fibroblastos activados, positivos para αSMA.

Se analizó la expresión de αSMA con el sistema de obtención de imágenes de alto contenido Operetta de un modo automatizado de alto rendimiento.

En los cultivos no estimulados, ~29,7 % (= 1) de los fibroblastos eran fibroblastos activados positivos a αSMA al final del periodo de cultivo de 24 horas, mientras que ~52 % (= 1,81) de los fibroblastos eran positivos a αSMA en los cultivos que se estimularon con TGFβ1 en ausencia de anticuerpos anti-IL-11.

Se añadieron anticuerpos anti-IL-11 (2 µg/ml) a los cultivos de fibroblastos que se estimularon con TGFβ1 y al final del periodo de cultivo de 24 h, se determinó el porcentaje de fibroblastos positivos a αSMA. Los porcentajes se normalizaron basándose en el porcentaje de fibroblastos positivos a αSMA observados en cultivos de fibroblastos que no se habían estimulado con TGFβ1.

Se demostró que 28 de los anticuerpos eran capaces de neutralizar la señalización mediada por IL-11 humana.

Un anticuerpo monoclonal comercial anti-IL-11 de ratón (IgG_{2A} monoclonal de ratón; clon n.º 22626; n.º de catálogo MAB218; R&D Systems, MN, EE. UU.) también se analizó respecto de su capacidad para inhibir la señalización por IL-11 humana en los experimentos. Se observó que este anticuerpo era capaz de reducir el porcentaje de fibroblastos activados en un 28,3 % (=0,99).

Varios de los clones neutralizaron la señalización por IL-11 humana en mayor medida que el anticuerpo anti-IL-11 de ratón comercial (patrón de la industria).

10.2 Capacidad para inhibir la señalización mediada por IL-11 de ratón

También se investigó la capacidad de los anticuerpos humanos para inhibir la señalización mediada por IL-11 de ratón, siguiendo el mismo procedimiento al descrito en la sección 10.1 anterior, pero usando fibroblastos dérmicos de ratón en lugar de fibroblastos auriculares humanos.

Tras 24 horas en cultivo, aproximadamente un 31,8 % (=1) de las células no estimuladas en cultivo eran fibroblastos activados. La estimulación con TGFβ1 dio como resultado un aumento de ~2 veces en el porcentaje de fibroblastos activados (68,8 % = 2,16) en comparación con los cultivos no estimulados.

Se demostró que los anticuerpos eran capaces de neutralizar la señalización mediada por IL-11 de ratón. El anticuerpo anti-IL-11 de IgG_{2A} monoclonal de ratón, clon n.º 22626, n.º de catálogo MAB218, también se analizó respecto de su capacidad para inhibir la señalización por IL-11 de ratón. Se observó que este anticuerpo era capaz de reducir el porcentaje de fibroblastos activados en un 39,4 % (=1,24).

Varios de los clones neutralizaron la señalización por IL-11 de ratón en mayor medida que el anticuerpo anti-IL-11 de ratón comercial (patrón de la industria).

10.3 Análisis de la afinidad del anticuerpo por IL-11 humana

Se analizó la afinidad de unión de los anticuerpos humanos anti-IL-11 humana a IL-11 humana mediante un ensayo ELISA.

Se obtuvo IL-11 recombinante humana de Genscript y el anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (específico para Fc) se obtuvo de Sigma. Las placas de ELISA Corning de 96 pocillos se obtuvieron de Sigma. El kit de sustrato de ELISA Pierce de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) se obtuvo de Life Technologies (solución de TMB a 0,4 g/ml, peróxido de hidrógeno al 0,02 % en tampón de ácido cítrico). La seroalbúmina bovina y el ácido sulfúrico se obtuvieron de Sigma. El tampón de lavado estaba formado por Tween-20 al 0,05 % en suero salino tamponado con fosfato (PBS-T). Los anticuerpos scFv-Fc se generaron como se ha

descrito anteriormente. Los controles de IgG de ratón y humana purificada se adquirieron de Life Technologies. Se usó Tecan Infinite 200 Pro NanoQuant para medir la absorbancia.

5 El análisis de dilución en serie Criss-Cross se llevó a cabo como se describe en Hornbeck et al., (2015) Curr Protoc Immunol 110, 2.1.1-23 para determinar la concentración óptima de antígeno de recubrimiento, anticuerpos primarios y secundarios.

10 Se llevó a cabo un ELISA indirecto para evaluar la afinidad de unión de los anticuerpos scFv-Fc primarios a un 50 % de la concentración eficaz (CE₅₀) como se ha descrito con anterioridad (Unverdorben et al., (2016) MAbs 8, 120-128.). Las placas de ELISA se recubrieron con 1 µg/ml de IL-11 recombinante humana durante una noche a 4 °C y los sitios de unión restantes se bloquearon con BSA al 2 % en PBS. Los anticuerpos scFv-Fc se diluyeron en BSA al 1 % en PBS, titulados para obtener concentraciones de trabajo de 800, 200, 50, 12,5, 3,125, 0,78, 0,195 y 0,049 ng/ml y se incubaron en duplicados durante 2 horas a temperatura ambiente. La detección de la unión de antígeno-anticuerpo se llevó a cabo con 15,625 ng/ml de anticuerpo anti-IgG humana (específico de Fc) conjugado a HRP. 15 Después de 2 horas de incubación con el anticuerpo de detección, se añadieron 100 µl de sustrato TMB durante 15 min y la reacción cromogénica se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 2 M.

20 La lectura de absorbancia se midió a 450 nm con una corrección de longitud de onda de referencia a 570 nm. Los datos se ajustaron con el programa informático GraphPad Prism con transformación logarítmica de las concentraciones de anticuerpo, seguido de análisis de regresión no lineal con la curva logística asimétrica (de cinco parámetros) de respuesta a la dosis para determinar los valores de CE₅₀ individuales.

25 Se emplearon los mismos materiales y procedimientos descritos anteriormente para determinar la afinidad de unión para los anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-11, con la excepción de que se usó anti-IgG de ratón conjugado a HRP (H&L) en lugar de anti-IgG humana conjugado a HRP.

30 Se emplearon los mismos materiales y procedimientos descritos anteriormente para determinar la afinidad de unión para los anticuerpos monoclonales humanos anti-IL-11 y los anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-11 a la IL-11 murina recombinante obtenida de Genscript.

Se usaron los resultados de los ensayos ELISA para determinar los valores de CE₅₀ para los anticuerpos.

10.4 Capacidad para inhibir la señalización mediada por IL-11 humana en varios tejidos

35 Se investigó la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la señalización mediada por IL-11 en fibroblastos obtenidos de una serie de tejidos diferentes, esencialmente como se ha descrito en la sección 10.1, salvo por que en lugar de fibroblastos auriculares cardíacos humanos, se usaron para los experimentos fibroblastos humanos procedentes de corazón, pulmón, riñón, ojos, piel, páncreas, bazo, intestino, cerebro y médula ósea.

40 Se demuestra que los anticuerpos anti-IL-11 son capaces de neutralizar la señalización en fibroblastos procedentes de los diversos tejidos, según se determina por la observación de una reducción relativa en la proporción de fibroblastos positivos a αSMA al final del periodo de 24 h de cultivo en presencia de anticuerpos anti-IL-11 en comparación con el cultivo en ausencia de anticuerpos.

45 Ejemplo 11: Inhibición de la fibrosis *in vivo* usando anticuerpos anti-IL-11

Se demostró la utilidad terapéutica de los anticuerpos anti-IL-11 humana en modelos de fibrosis de ratón *in vivo* para varios tejidos diferentes.

50 11.1 Fibrosis cardíaca

Se implanta una bomba y se trata a los ratones con AngII (2mg/kg/día) durante 28 días.

55 Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Al final del experimento, se evalúa el contenido de colágeno en las aurículas de los ratones usando un kit de ensayo colorimétrico a base de hidroxiprolina y se analizó mediante qPCR el nivel de expresión de ARN de los marcadores de fibrosis Col1A2, αSMA (ACTA2) y fibronectina (Fn1).

60 Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido cardíaco en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

11.2 Fibrosis renal

65 Se establece un modelo de ratón para fibrosis renal, en el que la fibrosis se induce por inyección intraperitoneal de ácido fólico (180mg/kg) en vehículo (NaHCO₃ 0,3M); a los ratones de control solo se les administró vehículo.

Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Los riñones se extrajeron en el día 28, se pesaron y o bien se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 % para tinción con tricromo de Masson y rojo de Siria o se congelaron inmediatamente para el ensayo de colágeno, ARN y estudios de proteínas.

5 El ARN total se extrae del riñón congelado instantáneamente usando reactivo Trizol (Invitrogen) y el método TissueLyzer de Qiagen, seguido de purificación en columna RNeasy (Qiagen). El ADNc se prepara usando el kit para síntesis de ADNc iScript™, en el que cada reacción contenía 1 µg de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa se lleva a cabo en muestras triplicadas con la tecnología TaqMan (Applied Biosystems) o Fast SYBR Green (Qiagen) usando StepOnePlus™ (Applied Biosystems) durante 40 ciclos. Los datos de expresión se normalizan al nivel de expresión de ARNm de GAPDH y se usa el método de 2- $\Delta\Delta C_t$ para calcular el múltiplo de cambio. Se somete a los riñones congelados de manera instantánea a hidrólisis ácida por calentamiento en HCl 6M a una concentración de 50 mg/ml (95 °C, 20 horas). Se cuantifica la cantidad de colágeno total en el hidrolizado basándose en la detección colorimétrica de la hidroxiprolina usando el kit de ensayo para colágeno total Qickzyme (Quickzyme Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido renal en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

11.3 Fibrosis pulmonar

Se trata a ratones con administración intratraqueal de bleomicina en el día 0 para establecer una respuesta fibrótica en el pulmón (fibrosis pulmonar).

Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Se sacrifica a los ratones en el día 21 y se analizan las diferencias en los marcadores de fibrosis.

Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido pulmonar en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

11.4 Fibrosis cutánea

Se trata a ratones con administración subcutánea de bleomicina en el día 0 para establecer una respuesta fibrótica en la piel.

Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Se sacrifica a los ratones en el día 21 y se analizan las diferencias en los marcadores de fibrosis.

Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido cutáneo en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

11.5 Fibrosis ocular

Se somete a una trabeculectomía a ratones en el día 0 para iniciar una respuesta de curación de heridas en el ojo.

Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa y se monitoriza la fibrosis en el tejido ocular.

Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido ocular en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

11.6 Otros tejidos

También se analiza el efecto del tratamiento con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 en la fibrosis en modelos de ratón de fibrosis para otros tejidos, tales como el hígado, el riñón, el intestino y también se analizó en un modelo relevante para fibrosis multiorgánica (es decir, sistémica).

Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de

marcadores de fibrosis.

Ejemplo 12: Anticuerpos anti-IL-11R α humano

5 Se generaron como se expone a continuación anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra IL-11R α humano.

Se clonó ADNc que codifica los aminoácidos para IL-11R α humano en plásmidos de expresión (Aldevron GmbH, Friburgo, Alemania).

10 Se inmunizó a los ratones mediante la aplicación intradérmica de partículas de oro recubiertas de ADN usando un dispositivo manual para el bombardeo de partículas ("pistola de genes"). Se recogieron muestras de suero de los ratones después de una serie de inmunizaciones y se ensayaron mediante citometría de flujo en células HEK que se habían transfectado de manera transitoria con plásmidos de expresión de IL-11R α humano (la expresión en la superficie celular de IL-11R α humano por células HEK transfectadas de manera estable se confirmó con anticuerpos anti-marcador que reconocían un marcador añadido al extremo N-terminal de la proteína IL-11R α).

15 Se aislaron las células productoras de anticuerpo de los ratones y se fusionaron con células de mieloma de ratón (Ag8) de acuerdo con procedimientos estándar.

20 Los anticuerpos productores de hibridomas específicos para IL-11R α se identificaron explorando respecto de la capacidad para unirse a células HEK que expresan IL-11R α mediante citometría de flujo.

25 Se prepararon sedimentos celulares de células de hibridoma positivas usando un agente de protección de ARN (RNAlater, n.º de cat. AM7020 de ThermoFisher Scientific) y se procesaron adicionalmente para la secuenciación de los dominios variables de los anticuerpos.

30 La secuenciación se llevó a cabo usando el kit de secuenciación de ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Life Technologies®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los datos se recogieron usando un sistema analizador de ADN 3730xl y el programa informático Unified Data Collection (Life Technologies®). El montaje de la secuencia se llevó a cabo usando el alineador CodonCode (CodonCode Corporation). Las llamadas de bases mixtas se resolvieron asignando de manera automática la llamada de base más prevalente a las llamadas de bases mixtas. La prevalencia se determinó mediante tanto la frecuencia de una llamada de base como por la calidad individual de las llamadas de base.

35 En total, se generaron 17 clones de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-11R α humano.

Ejemplo 13: Caracterización funcional de anticuerpos anti- IL-11R α humano

13.1 Capacidad para inhibir la señalización mediada por IL-11/IL-11R humano

40 Para investigar la capacidad de los anticuerpos anti-IL-11R α para neutralizar la señalización mediada por IL-11/IL-11R humano, se cultivaron fibroblastos auriculares cardíacos humanos en los pocillos de placas de 96 pocillos en presencia de TGF β 1 (5 ng/ml) durante 24 horas, en presencia o ausencia de los anticuerpos anti-IL-11R α . Este estímulo profibrótico promueve la expresión de IL-11, que a su vez, impulsa la transición de los fibroblastos quiescentes a fibroblastos activados, positivos para α SMA. Se ha demostrado previamente que la neutralización de IL-11 previene la transición inducida por TGF β 1 a fibroblastos activados, positivos para α SMA.

50 Se añadieron anticuerpos anti-IL-11R α (2 μ g/ml) a los cultivos de fibroblastos que se estimularon con TGF β 1 y al final del periodo de cultivo de 24 h, se determinó el porcentaje de fibroblastos positivos a α SMA. Los porcentajes se normalizaron basándose en el porcentaje de fibroblastos positivos a α SMA observados en cultivos de fibroblastos que no se habían estimulado con TGF β 1.

55 Se analizó la expresión de α SMA con el sistema de obtención de imágenes de alto contenido Operetta de un modo automatizado de alto rendimiento.

La estimulación con TGF β 1 dio como resultado un aumento de 1,58 veces en el número de fibroblastos activados positivos a α SMA al final del periodo de cultivo de 24 horas en ausencia de anticuerpos anti-IL-11R α .

60 Un anticuerpo monoclonal comercial anti-IL-11 de ratón (IgG_{2A} monoclonal de ratón; clon n.º 22626; n.º de catálogo MAB218; R&D Systems, MN, EE. UU.) se incluyó como control. Se observó que este anticuerpo era capaz de reducir el porcentaje de fibroblastos activados a 0,89 veces el porcentaje de fibroblastos activados en cultivos no estimulados (es decir, en ausencia de estimulación con TGF β 1).

65 Se observó que los anticuerpos anti-IL-11R α eran capaces de inhibir la señalización de IL-11/IL-11R en fibroblastos humanos y varios eran capaces de inhibir la señalización de IL-11/IL-11R en mayor medida que el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-11.

13.2 Capacidad para inhibir la señalización mediada por IL-11 de ratón

También se investigó la capacidad de los anticuerpos anti-IL-11R α para inhibir la señalización mediada por IL-11 de ratón, siguiendo el mismo procedimiento al descrito en la sección 13.1 anterior, pero usando fibroblastos auriculares de ratón en lugar de fibroblastos auriculares humanos.

La estimulación con TGF β 1 dio como resultado un aumento de 2,24 veces en el número de fibroblastos activados positivos a α SMA al final del periodo de cultivo de 24 horas en ausencia de anticuerpos anti-IL-11R α .

El anticuerpo monoclonal comercial anti-IL-11 de ratón (IgG_{2A} monoclonal de ratón; clon n.º 22626; n.º de catálogo MAB218; R&D Systems, MN, EE. UU.) se incluyó como control. Se observó que este anticuerpo era capaz de reducir el porcentaje de fibroblastos activados a 1,44 veces el porcentaje de fibroblastos activados en cultivos no estimulados (es decir, en ausencia de estimulación con TGF β 1).

Se observó que los anticuerpos anti-IL-11R α eran capaces de inhibir la señalización de IL-11/IL-11R en fibroblastos de ratón y varios eran capaces de inhibir la señalización de IL-11/IL-11R en mayor medida que el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-11.

13.3 Exploración de la capacidad para unirse a IL-11R α

Se subclonaron los hibridomas de ratón productores de anticuerpos anti-IL-11R α humano y se analizó el sobrenadante de cultivo de los hibridomas subclonados mediante el ensayo iQue de "mezclar y medir" respecto de (i) su capacidad para unirse a IL-11R α humano y (ii) su reactividad cruzada por antígenos distintos de IL-11R α .

Brevemente, se mezclaron células de control marcadas (que no expresan IL-11R α en la superficie celular) y células diana no marcadas que expresan IL-11R α humano en su superficie (después de una transfección transitoria con un plásmido que codifica un IL-11R α humano marcado con FLAT) con el sobrenadante del cultivo celular (que contenía anticuerpos de ratón anti-IL-11R α) y anticuerpos secundarios de detección (anticuerpo anti-IgG de ratón marcado fluorescentemente).

Después, se analizaron las células usando el sistema de exploración HTFC (iQue) para los dos marcadores (es decir, el marcador celular y el marcador en el anticuerpo secundario). La detección del anticuerpo secundario en las células no marcadas que expresan IL-11R α indicó la capacidad de los anticuerpos de ratón anti-IL-11R α para unirse a IL-11R α . La detección del anticuerpo secundario en las células de control marcadas indicó reactividad cruzada de los anticuerpos de ratón anti-IL-11R α por una diana distinta de IL-11R α .

Como condición de control positivo, se incubaron células marcadas y no marcadas con un anticuerpo anti-marcador FLAG de ratón como anticuerpo primario.

La mayoría de los hibridomas subclonados expresaron anticuerpo que era capaz de unirse a IL-11R α humano y que reconocían esta diana con elevada especificidad.

13.4 Análisis de la afinidad del anticuerpo por IL-11R α humano

Se analizó la afinidad de unión de los anticuerpos anti-IL-11R α humano a IL-11R α humano mediante un ensayo ELISA.

Se obtuvo IL-11R α recombinante humano de Genscript y el anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (específico para Fc) se obtuvo de Sigma. Las placas de ELISA Corning de 96 pocillos se obtuvieron de Sigma. El kit de sustrato de ELISA Pierce de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) se obtuvo de Life Technologies (solución de TMB a 0,4 g/ml, peróxido de hidrógeno al 0,02 % en tampón de ácido cítrico). La seroalbúmina bovina y el ácido sulfúrico se obtuvieron de Sigma. El tampón de lavado estaba formado por Tween-20 al 0,05 % en suero salino tamponado con fosfato (PBS-T). Los controles de IgG purificada se adquirieron de Life Technologies. Se usó Tecan Infinite 200 Pro NanoQuant para medir la absorbancia.

El análisis de dilución en serie Criss-Cross se llevó a cabo como se describe en Hornbeck et al., (2015) Curr Protoc Immunol 110, 2.1.1-23 para determinar la concentración óptima de antígeno de recubrimiento, anticuerpos primarios y secundarios.

Se llevó a cabo un ELISA indirecto para evaluar la afinidad de unión de los anticuerpos de ratón anti-IL-11R α a un 50 % de la concentración eficaz (CE₅₀) como se ha descrito con anterioridad (Unverdorben et al., (2016) MAbs 8, 120-128.). Las placas de ELISA se recubrieron con 1 μ g/ml de IL-11R α recombinante humano durante una noche a 4 °C y los sitios de unión restantes se bloquearon con BSA al 2 % en PBS. Los anticuerpos se diluyeron en BSA al 1 % en PBS, titulados para obtener concentraciones de trabajo de 800, 200, 50, 12,5, 3,125, 0,78, 0,195 y 0,049 ng/ml y se incubaron en duplicados durante 2 horas a temperatura ambiente. La detección de la unión antígeno-anticuerpo se llevó a cabo con 15,625 ng/ml de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP. Después de 2 horas

de incubación con el anticuerpo de detección, se añadieron 100 µl de sustrato TMB durante 15 min y la reacción cromogénica se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 2 M. La lectura de absorbancia se midió a 450 nm con una corrección de longitud de onda de referencia a 570 nm. Los datos se ajustaron con el programa informático GraphPad Prism con transformación logarítmica de las concentraciones de anticuerpo, seguido de análisis de regresión no lineal con la curva logística asimétrica (de cinco parámetros) de respuesta a la dosis para determinar los valores de CE₅₀ individuales.

13.5 Capacidad para inhibir la señalización de IL-11/IL-11R humano en varios tejidos

- 10 Se investigó la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la señalización de IL-11/IL-11R en fibroblastos obtenidos de una serie de tejidos diferentes, esencialmente como se ha descrito en la sección 13.1, salvo por que en lugar de fibroblastos auriculares cardíacos humanos, se usaron para los experimentos fibroblastos humanos procedentes de corazón, pulmón, riñón, ojos, piel, páncreas, bazo, intestino, cerebro y médula ósea.
- 15 Se demuestra que los anticuerpos anti-IL-11R α son capaces de neutralizar la señalización de IL-11/IL-11R en fibroblastos procedentes de los diversos tejidos, según se determina por la observación de una reducción relativa en la proporción de fibroblastos positivos a α SMA al final del periodo de 24 h de cultivo en presencia de anticuerpos anti-IL-11R α en comparación con el cultivo en ausencia de anticuerpos.

20 Ejemplo 14: Inhibición de la fibrosis *in vivo* usando anticuerpos anti-IL-11R α

Se demostró la utilidad terapéutica de los anticuerpos anti- IL-11R α humano en modelos de fibrosis de ratón *in vivo* para varios tejidos diferentes.

25 14.1 Fibrosis cardíaca

Se implanta una bomba y se trata a los ratones con AngII (2mg/kg/día) durante 28 días.

30 Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Al final del experimento, se evalúa el contenido de colágeno en las aurículas de los ratones usando un kit de ensayo colorimétrico a base de hidroxiprolina y se analizó mediante qPCR el nivel de expresión de ARN de los marcadores de fibrosis Col1A2, α SMA (ACTA2) y fibronectina (Fn1).

35 Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido cardíaco en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

14.2 Fibrosis renal

40 Se establece un modelo de ratón para fibrosis renal, en el que la fibrosis se induce por inyección intraperitoneal de ácido fólico (180mg/kg) en vehículo (NaHCO₃ 0,3M); a los ratones de control solo se les administró vehículo.

45 Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Los riñones se extrajeron en el día 28, se pesaron y o bien se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 % para tinción con tricromo de Masson y rojo de Siria o se congelaron inmediatamente para el ensayo de colágeno, ARN y estudios de proteínas.

50 El ARN total se extrae del riñón congelado instantáneamente usando reactivo Trizol (Invitrogen) y el método TissueLyzer de Qiagen, seguido de purificación en columna RNeasy (Qiagen). El ADNc se prepara usando el kit para síntesis de ADNc iScriptTM, en el que cada reacción contenía 1 µg de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa se lleva a cabo en muestras triplicadas con la tecnología TaqMan (Applied Biosystems) o Fast SYBR Green (Qiagen) usando StepOnePlusTM (Applied Biosystems) durante 40 ciclos. Los datos de expresión se normalizan al nivel de expresión de ARNm de GAPDH y se usa el método de 2- $\Delta\Delta$ Ct para calcular el múltiplo de cambio. Se somete a los riñones congelados de manera instantánea a hidrólisis ácida por calentamiento en HCl 6M a una concentración de 50 mg/ml (95 °C, 20 horas). Se cuantifica la cantidad de colágeno total en el hidrolizado basándose en la detección colorimétrica de la hidroxiprolina usando el kit de ensayo para colágeno total Qickzyme (Quickzyme Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

60 Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido renal en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

14.3 Fibrosis pulmonar

Se trata a ratones con administración intratraqueal de bleomicina en el día 0 para establecer una respuesta fibrótica en el pulmón (fibrosis pulmonar).

5 Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Se sacrifica a los ratones en el día 21 y se analizan las diferencias en los marcadores de fibrosis.

10 Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido pulmonar en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

14.4 Fibrosis cutánea

15 Se trata a ratones con administración subcutánea de bleomicina en el día 0 para establecer una respuesta fibrótica en la piel.

20 Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Se sacrifica a los ratones en el día 21 y se analizan las diferencias en los marcadores de fibrosis.

25 Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido cutáneo en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

14.5 Fibrosis ocular

30 Se somete a una trabeculectomía a ratones en el día 0 para iniciar una respuesta de curación de heridas en el ojo.

Se administran anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α o anticuerpos de control a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa y se monitoriza la fibrosis en el tejido ocular.

35 Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido ocular en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

14.6 Otros tejidos

40 También se analiza el efecto del tratamiento con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α en la fibrosis en modelos de ratón de fibrosis para otros tejidos, tales como el hígado, el riñón, el intestino y también se analizó en un modelo relevante para fibrosis multiorgánica (es decir, sistémica).

45 Los ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-11R α tienen una respuesta fibrótica reducida en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

Ejemplo 15: Receptores señuelo de IL-11

50 15.1 Construcciones de receptor señuelo de IL-11

Se diseñaron moléculas de receptor señuelo de IL-11 y se clonaron en el vector pTT5 para la expresión recombinante en células 293-6E.

55 Brevemente, un inserto para el plásmido que comprende ADNc que codifica los dominios de unión a ligando D1, D2 y D3 de gp130 en fase con el ADNc que codifica una región enlazadora de 50 aminoácidos o 33 aminoácidos, seguido de un ADNc que codifica los dominios de unión a ligando D2 y D3 de IL-11R α humano, seguido del ADNc que codifica el marcador FLAG. El inserto de ADNc incorporó una secuencia líder, secuencias Kozak en el extremo 5' e incluyó un sitio de restricción de EcoRI 5' y un sitio de restricción de HindIII 3' (cadena abajo de un codón de parada) para su inserción en el vector pTT5.

60 Las dos construcciones que codifican una molécula de receptor señuelo de IL-11 que tienen una secuencia de 50 aminoácidos o de 33 aminoácidos se denominan, respectivamente, receptor señuelo de IL-11 1 (D11R1) y receptor señuelo de IL-11 2 (D11R2).

65

15.2 Expresión y purificación del receptor señuelo de IL-11

Las construcciones se transfectaron en células 293-6E para su expresión recombinante y purificación.

- 5 Las células 293-6E se cultivaron en medio de expresión asérico Freestyle™ 293 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las células se mantuvieron en matraces Erlenmeyer (Corning Inc., Acton, MA) a 37 °C con un 5 % de CO₂ en un agitador orbital (VWR Scientific, Chester, PA).

- 10 Un día antes de la transfección, se sembraron las células a una densidad adecuada en matraces Erlenmeyer de Corning. En el día de la transfección, se mezclaron el ADN y el reactivo de transfección a una relación óptima y después se añadieron al matraz con células listas para la transfección. Los plásmidos recombinantes que codificaban D11R1 y D11R2 se transfectaron de manera transitoria en cultivos de células 293-6E en suspensión en dos días separados.

- 15 Se recogieron los sobrenadantes de cultivo en el día 6 y se usaron para la purificación. Brevemente, se centrifugaron y filtraron los caldos de cultivo celular. Se añadieron 0,5 ml de resina a los sobrenadantes de cultivo y se incubaron durante 3-4 horas para capturar la proteína diana.

- 20 Después del lavado y la elución con tampones adecuados, se analizaron las fases eluidas mediante SDS-PAGE y transferencia de Western usando Ab policlonal de conejo anti-FLAG (GenScript, n.º de cat. A00170) para confirmar la expresión de las moléculas de receptor señuelo de IL-11 marcadas con FLAG.

Las especies purificadas se cuantificaron y almacenaron a -80 °C.

25 **Ejemplo 16: Caracterización funcional de los receptores señuelo de IL-11**

16.1 Capacidad para inhibir la señalización mediada por IL-11 humana

- 30 Para investigar la capacidad para neutralizar la señalización mediada por IL-11 humana, se cultivaron fibroblastos auriculares cardíacos humanos en los pocillos de placas de 96 pocillos en presencia de TGFβ1 (5 ng/ml) durante 24 horas, en presencia o ausencia de diversas concentraciones de D11R1 o D11R2.

- 35 TGFβ1 promueve la expresión de IL-11, que a su vez, impulsa la transición de los fibroblastos quiescentes a fibroblastos activados, positivos para αSMA. Se ha demostrado previamente que la neutralización de IL-11 previene la transición inducida por TGFβ1 a fibroblastos activados, positivos para αSMA.

Se analizó la expresión de αSMA con el sistema de obtención de imágenes de alto contenido Operetta de un modo automatizado de alto rendimiento.

- 40 Se añadió D11R1 o D11R2 a cultivos de fibroblastos que se estimularon con TGFβ1 a concentraciones finales de 5 ng/ml, 50 ng/ml y 500 ng/ml al final del periodo de cultivo de 24 horas, se determinó el porcentaje de fibroblastos positivos a αSMA en el cultivo.

- 45 Se demostró que tanto D11R1 como D11R2 son capaces de neutralizar la señalización mediada por IL-11 humana de una manera dependiente de la dosis.

- 50 Los resultados de los experimentos se muestran en las figuras 32A y 32B. Se demostró que tanto D11R1 como D11R2 son capaces de neutralizar la señalización mediada por IL-11 humana de una manera dependiente de la dosis.

Se determinó que la CI₅₀ para las moléculas D11R1 y D11R2 era de ~1 nM.

16.2 Capacidad para inhibir la señalización mediada por IL-11 de ratón

- 55 Se investigó la capacidad de D11R1 y D11R2. para inhibir la señalización mediada por IL-11 de ratón, siguiendo el mismo procedimiento al descrito en la sección 16.1 anterior, pero usando fibroblastos dérmicos de ratón en lugar de fibroblastos auriculares humanos.

- 60 Se demostró que D11R1 y D11R2. son capaces de neutralizar la señalización de IL-11/IL-11R en fibroblastos dérmicos de ratón, según se determina por la observación de una reducción relativa en la proporción de fibroblastos positivos a αSMA al final del periodo de 24 h de cultivo en presencia de D11R1 o D11R2, en comparación con el cultivo en ausencia de los receptores señuelo de IL-11.

16.3 Análisis de la afinidad del receptor señuelo de IL-11 por IL-11

- 65 Se analizó la afinidad de unión de D11R1 y D11R2 a IL-11 humana mediante un ensayo ELISA.

Se obtuvo IL-11 recombinante humana de Genscript y se obtuvo el anticuerpo anti-FLAG conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP). Las placas de ELISA Corning de 96 pocillos se obtuvieron de Sigma. El kit de sustrato de ELISA Pierce de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) se obtuvo de Life Technologies (solución de TMB a 0,4 g/ml, peróxido de hidrógeno al 0,02 % en tampón de ácido cítrico). La seroalbúmina bovina y el ácido sulfúrico se obtuvieron de Sigma. El tampón de lavado estaba formado por Tween-20 al 0,05 % en suero salino tamponado con fosfato (PBS-T). Se usó Tecan Infinite 200 Pro NanoQuant para medir la absorbancia.

Se llevó a cabo un ELISA indirecto para evaluar la afinidad de unión de D11R1 y D11R2 a un 50 % de la concentración eficaz (CE₅₀) como se ha descrito con anterioridad (Unverdorben et al., (2016) MABs 8, 120-128.). Las placas de ELISA se recubrieron con 1 µg/ml de IL-11 recombinante humana durante una noche a 4 °C y los sitios de unión restantes se bloquearon con BSA al 2 % en PBS. Se diluyeron D11R1 y D11R2 en BSA al 1 % en PBS, titulados para obtener concentraciones de trabajo de 800, 200, 50, 12,5, 3,125, 0,78, 0,195 y 0,049 ng/ml y se incubaron en duplicados durante 2 horas a temperatura ambiente. La detección de la unión de antígeno-receptor se realizó con IL-11 se lleva a cabo con anticuerpo anti-FLAG conjugado a HRP. Después de 2 horas de incubación con el anticuerpo de detección, se añadieron 100 µl de sustrato TMB durante 15 min y la reacción cromogénica se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 2 M. La lectura de absorbancia se midió a 450 nm con una corrección de longitud de onda de referencia a 570 nm. Los datos se ajustaron con el programa informático GraphPad Prism con transformación logarítmica de las concentraciones de receptor señuelo de IL-11, seguido de análisis de regresión no lineal con la curva logística asimétrica (de cinco parámetros) de respuesta a la dosis para determinar los valores de CE₅₀.

Se emplearon los mismos materiales y procedimientos descritos anteriormente para determinar la afinidad de unión a IL-11 murina recombinante obtenida de Genscript.

16.4 Capacidad para inhibir la señalización mediada por IL-11 humana en varios tejidos

Se investigó la capacidad de los receptores señuelo de IL-11 D11R1 y D11R2 para neutralizar la señalización mediada por IL-11 en fibroblastos obtenidos de una serie de tejidos diferentes, esencialmente como se ha descrito en la sección 18.1, salvo por que en lugar de fibroblastos auriculares cardíacos humanos, se usaron para los experimentos fibroblastos humanos procedentes de corazón, pulmón, riñón, ojos, piel, páncreas, bazo, intestino, cerebro y médula ósea.

Se demuestra que D11R1 y D11R2 son capaces de neutralizar la señalización en fibroblastos procedentes de los diversos tejidos, según se determina por la observación de una reducción relativa en la proporción de fibroblastos positivos a αSMA al final del periodo de 24 h de cultivo en presencia de los receptores señuelo de IL-11, en comparación con el cultivo en ausencia de los receptores señuelo de IL-11.

Ejemplo 17: Inhibición de la fibrosis *in vivo* usando receptores señuelo de IL-11

Se demostró la utilidad terapéutica de los receptores señuelo de IL-11 en modelos de fibrosis de ratón *in vivo* para varios tejidos diferentes.

17.1 Fibrosis cardíaca

Se implanta una bomba y se trata a los ratones con AngII (2mg/kg/día) durante 28 días.

Se administran los receptores señuelo de IL-11 D11R1 o D11R2 a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Al final del experimento, se evalúa el contenido de colágeno en las aurículas de los ratones usando un kit de ensayo colorimétrico a base de hidroxiprolina y se analizó mediante qPCR el nivel de expresión de ARN de los marcadores de fibrosis Col1A2, αSMA (ACTA2) y fibronectina (Fn1).

Los ratones tratados con receptores señuelo de IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido cardíaco en comparación con los controles no tratados/tratados con vehículo, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

17.2 Fibrosis renal

Se establece un modelo de ratón para fibrosis renal, en el que la fibrosis se induce por inyección intraperitoneal de ácido fólico (180 mg/kg) en vehículo (NaHCO₃ 0,3M); a los ratones de control solo se les administró vehículo.

Se administran los receptores señuelo de IL-11 D11R1 o D11R2 a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Los riñones se extrajeron en el día 28, se pesaron y o bien se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 % para tinción con tricromo de Masson y rojo de Siria o se congelaron inmediatamente para el ensayo de colágeno, ARN y estudios de proteínas.

El ARN total se extrae del riñón congelado instantáneamente usando reactivo Trizol (Invitrogen) y el método TissueLyzer de Qiagen, seguido de purificación en columna RNeasy (Qiagen). El ADNc se prepara usando el kit para síntesis de ADNc iScript™, en el que cada reacción contenía 1 µg de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa se lleva a cabo en muestras triplicadas con la tecnología TaqMan (Applied Biosystems) o Fast SYBR Green (Qiagen) usando StepOnePlus™ (Applied Biosystems) durante 40 ciclos. Los datos de expresión se normalizan al nivel de expresión de ARNm de GAPDH y se usa el método de 2- $\Delta\Delta C_t$ para calcular el múltiplo de cambio. Se somete a los riñones congelados de manera instantánea a hidrólisis ácida por calentamiento en HCl 6M a una concentración de 50 mg/ml (95 °C, 20 horas). Se cuantifica la cantidad de colágeno total en el hidrolizado basándose en la detección colorimétrica de la hidroxiprolina usando el kit de ensayo para colágeno total Qickzyme (Quickzyme Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los ratones tratados con receptores señuelo de IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido renal en comparación con los controles no tratados/tratados con vehículo, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

17.3 Fibrosis pulmonar

Se trata a ratones con administración intratraqueal de bleomicina en el día 0 para establecer una respuesta fibrótica en el pulmón (fibrosis pulmonar).

Se administran los receptores señuelo de IL-11 D11R1 o D11R2 a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Se sacrifica a los ratones en el día 21 y se analizan las diferencias en los marcadores de fibrosis.

Los ratones tratados con receptores señuelo de IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido pulmonar en comparación con los controles no tratados/tratados con vehículo, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

17.4 Fibrosis cutánea

Se trata a ratones con administración subcutánea de bleomicina en el día 0 para establecer una respuesta fibrótica en la piel.

Se administran los receptores señuelo de IL-11 D11R1 o D11R2 a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa. Se sacrifica a los ratones en el día 21 y se analizan las diferencias en los marcadores de fibrosis.

Los ratones tratados con receptores señuelo de IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido cutáneo en comparación con los controles no tratados/tratados con vehículo, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

17.5 Fibrosis ocular

Se somete a una un procedimiento de trabeculectomía a ratones como se ha descrito en el ejemplo 7.6 anterior para iniciar una respuesta de curación de heridas en el ojo.

Se administran los receptores señuelo de IL-11 D11R1 o D11R2 a diferentes grupos de ratones por inyección intravenosa y se monitoriza la fibrosis en el tejido ocular.

Los ratones tratados con receptores señuelo de IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en tejido ocular en comparación con los controles no tratados/tratados con vehículo, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

17.6 Otros tejidos

También se analiza el efecto del tratamiento con los receptores señuelo de IL-11 D11R1 o D11R2 en modelos de ratón de fibrosis para otros tejidos, tales como el hígado, el riñón, el intestino y también se analizó en un modelo relevante para fibrosis multiorgánica (es decir, sistémica).

Se mide la respuesta fibrótica y se compara entre los ratones tratados con receptores señuelo de IL-11 y ratones no tratados o los controles tratados con vehículo. Los ratones tratados con receptores señuelo de IL-11 tienen una respuesta fibrótica reducida en comparación con los controles no tratados/tratados con vehículo, según se evidencia por la expresión reducida de marcadores de fibrosis.

Ejemplo 18: Biomarcadores genéticos para la respuesta de IL-11

Además de medir la proteína IL-11 como un potencial biomarcador para la fibrosis, los presentes inventores desarrollaron un ensayo que puede predecir el estado de secreción de IL-11 en seres humanos. Este ensayo podría usarse como diagnóstico de acompañamiento en ensayos clínicos relacionados con IL-11.

En primer lugar, los presentes inventores generaron datos de RNA-Seq (figura 16) y determinaron el genotipo de 69 individuos étnicamente emparejados (Chinos) en la cohorte usando una matriz de SNP basada en hibridación de sondas fluorescentes suministradas por Illumina (HumanOmniExpress 24).

Después, los presentes inventores llevaron a cabo un análisis de eQTL de enlace por todo el genoma para evaluar si los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) afectan a los niveles de transcrito de ARN de IL-11 o IL-11RA en fibroblastos no estimulados, y en fibroblastos estimulados con TGFβ1 (5ng/ml, 24h). Los presentes inventores también evaluaron si el aumento en la IL-11 tras la estimulación con TGFβ1 (= respuesta) era dependiente del genotipo.

En primer lugar, los presentes inventores cuantificaron el recuento de lectura tanto para IL-11 como para IL-11 RA en todos los individuos y transformaron estos recuentos usando la estrategia de estabilización de la varianza (VST) del método DESeq2 (Love et al., Genome Biology 2014 15:550). Después, los presentes inventores tomaron en consideración la expresión de IL-11 e IL-11 RA en células no estimuladas (VST_{noestim}) y estimuladas (VST_{estim}). Para evaluar el aumento en la IL-11, los presentes inventores también calcularon el incremento en la expresión en forma de VST_{estim} - VST_{noestim}. Los presentes inventores corrigieron los valores de expresión usando covariables, tales como el lote de la biblioteca de secuenciación de ARN, la puntuación de calidad RIN del ARN, la concentración de la biblioteca, el tamaño de fragmentos de la biblioteca, la edad, y el género antes de los análisis. Se analizaron los pares de SNP y expresión de transcrito o incremento de la expresión usando la estrategia de la matriz eQTL (Andrey A. Shabalín., Bioinformatics, 15 de mayo de 2012; 28(10): 1353-1358).

Los presentes inventores no observaron variaciones en *cis* o *trans* que afectasen de manera significativa a la expresión de IL-11 en células no estimuladas. Sin embargo, los presentes inventores detectaron SNP distantes que regulaban la expresión en fibroblastos estimulados (= fibróticos). Estas variantes estratifican a la población entre individuos que expresan bajos niveles de IL-11 y aquellos que expresan elevadas cantidades de IL-11 en la fibrosis. Los presentes inventores también detectaron variantes locales y distales que predecían el aumento en la expresión de IL-11 en respuesta a TGFβ1. Estas variantes pueden usarse para estratificar individuos en individuos con una reacción intensa y con una reacción escasa en la fibrosis.

Los SNP identificados se muestran en las figuras 33 a 35 y los datos que los acompañan se muestran en las figuras 36 y 37.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Tratamiento de la fibrosis

<130> RIC/FP7164916

<150> GB1522186.4

<151> 16/12/2015

<160> 77

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2381

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 692 773 T3

actgcgcggg cccctgctget cagggcacat gcctcccctc cccaggccgc ggcccagctg	60
accctcgggg ctccccggc agcggacagg gaagggttaa aggcccccg ctcctgccc	120
cctgccctgg ggaaccctg gccctgtggg gacatgaact gtgtttgccg cctggtcctg	180
gtcgtgctga gcctgtggcc agatacagct gtcgcccctg ggccaccacc tggccccct	240
cgagtttccc cagaccctcg ggccgagctg gacagcaccg tgctcctgac ccgctctctc	300
ctggcggaca cgcggcagct ggctgcacag ctgagggaca aattcccagc tgacggggac	360
cacaacctgg attccctgcc caccctggcc atgagtgcgg gggcactggg agctctacag	420
ctcccagggtg tgctgacaag gctgcgagcg gacctactgt cctacctgcg gcacgtgcag	480
tggctgcgcc gggcagggtg ctcttccctg aagaccctgg agcccagct gggcacctg	540
caggcccagc tggaccggct gctgcgcggg ctgcagctcc tgatgtcccg cctggccctg	600
ccccagccac ccccgacc cccggcgccc ccgctggcgc cccctcctc agcctggggg	660
ggcatcaggg ccgcccacgc catcctgggg gggctgcacc tgacacttga ctgggcccgtg	720
aggggactgc tgctgctgaa gactcggctg tgacccgggg cccaaagcca ccaccgtcct	780
tccaaagcca gatcttattt atttatttat ttcagtactg ggggcgaaac agccagggtga	840
tcccccgcc attatctccc cctagttaga gacagtcctt ccgtgaggcc tggggggcat	900
ctgtgcctta tttatactta tttatttcag gagcaggggt gggaggcagg tggactcctg	960
ggtccccgag gaggagggga ctggggctccc ggattcttgg gtctccaaga agtctgtcca	1020
cagacttctg ccctggctct tccccatota ggccctgggca ggaacatata ttatttattt	1080
aagcaattac ttttcatggt ggggtgggga cggaggggaa agggaagcct gggttttgt	1140
acaaaaatgt gagaaacctt tgtgagacag agaacaggga attaaatgtg tcatacatat	1200
ccacttgagg gcgatttgtc tgagagctgg ggctggatgc ttgggtaact ggggcagggc	1260

ES 2 692 773 T3

aggtggaggg gagacctoca ttcaggtgga ggtcccgagt gggcggggca gogactggga 1320
 gatgggtcgg tcacccagac agctctgtgg aggcagggtc tgagccttgc ctggggcccc 1380
 gcactgcata gggccttttg tttgtttttt gagatggagt ctgctctgtg tgcctaggct 1440
 ggagtgcagt gaggcaatct gaggtcactg caacctccac ctcccgggtt caagcaattc 1500
 tcctgcctca gcctcccgat tagctgggat cacaggtgtg caccacatg occagctaata 1560
 tattttatttc ttttgtattt ttagtagaga cagggtttca ccatgttggc caggctgggt 1620
 tcgaactcct gacctcaggt gatcctcctg cctcggcctc ccaaagtgtc gggattacag 1680
 gtgtgagcca ccacacctga cccataggtc ttcaataaat atttaatgga aggttcocaca 1740
 agtcaccctg tgatcaacag taccogtatg ggacaaagct gcaaggtcaa gatggttcat 1800
 tatggctgtg ttcacatag caaactggaa acaatctaga tatccaacag tgaggggttaa 1860
 gcaacatggg gcatctgtgg atagaacgcc acccagccgc ccggagcagg gactgtcatt 1920
 cagggagggt aaggagagag gcttgcttgg gatatagaaa gatatcctga cattggccag 1980
 gcatgggtggc tcacgcctgt aatcctggca ctttgggagg acgaagcgag tggatcactg 2040
 aagtccaaga gttcgagacc ggctgcgag acatggcaaa accctgtctc aaaaaagaaa 2100
 gaatgatgtc ctgacatgaa acagcaggct acaaaaccac tgcatgctgt gatoccaatt 2160
 ttgtgttttt ctttctatat atggattaaa acaaaaatcc taaagggaaa tacgccaaaa 2220
 tgttgacaat gactgtctcc aggtcaaagg agagaggtgg gattgtgggt gacttttaat 2280
 gtgtatgatt gtctgtattt tacagaattt ctgccatgac tgtgtatttt gcatgacaca 2340
 ttttaaaaat aataaacact attttagaa taacagaaaa a 2381

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ccttccaaag ccagatctt 19

10 <210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 3

gcctgggcag gaacatata 19

<210> 4

<211> 19

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

cctgggcagg aacatata 19

25 <210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30

ES 2 692 773 T3

<400> 5
ggttcattat ggctgtgtt 19

5 <210> 6
<211> 1696
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 6

gctgtagctg	gtgagaggaa	gtcctagagg	ctatggacac	tctgctgctg	ggatcaccga	60
gatgagcagc	agctgctcag	ggctgagcag	ggcctctggg	gccgtggcta	cagccctggt	120
gtctgcctcc	tccccctgcc	cccaggcctg	gggcccccca	ggggtccagt	atgggcagcc	180
agggaggtcc	gtgaagctgt	gttgtcctgg	agtgactgcc	ggggaccag	tgtcctggtt	240
tccgggatggg	gagccaaagc	tgctccaggg	acctgactct	gggctagggc	atgaactggt	300
cctggcccag	gcagacagca	ctgatgaggg	cacctacatc	tgccagacc	tggatggtgc	360
acttgggggc	acagtgacc	tgcaactggg	ctaccctcca	gcccgcctg	ttgtctcctg	420
ccaagcagcc	gactatgaga	acttctcttg	cacttggagt	cccagccaga	tcagcggttt	480
accaccccgc	tacctcacct	cctacaggaa	gaagacagtc	ctaggagctg	atagccagag	540
gaggagtcca	tccacagggc	cctggccatg	cccacaggat	cccctagggg	ctgcccgcctg	600
tgttgtccac	ggggctgagt	tctggagcca	gtaccggatt	aatgtgactg	aggtgaacct	660
actgggtgcc	agcacacgcc	tgctggatgt	gagcttgag	agcatcttgc	gcctgacct	720
accccagggc	ctgcgggtag	agtcagtacc	aggttacccc	cgacgcctgc	gagccagctg	780
gacataacct	gcctcctggc	cgtgccagcc	ccacttcctg	ctcaagttcc	gtttgcagta	840
ccgtccggcg	cagcatccag	cctgggtccac	ggcggagcca	gctggactgg	aggaggtgat	900
cacagatgct	gtggctgggc	tgccccatgc	tgtacgagtc	agtgcccggg	actttctaga	960
tgctggcacc	tggagcacct	ggagcccggg	ggcctgggga	actccgagca	ctgggacct	1020
accaaaggag	ataccagcat	ggggccagct	acacacgcag	ccagaggtgg	agcctcaggt	1080
ggacagccct	gctcctccaa	ggccctccct	ccaaccacac	cctcggctac	ttgatcacag	1140
ggactctgtg	gagcaggtag	ctgtgctggc	gtctttggga	atcctttctt	tcctgggact	1200
ggcggctggg	gcctggcac	tggggctctg	gctgaggctg	agacggggtg	ggaaggatgg	1260
atccccaaag	cctgggttct	tggcctcagt	gattccagtg	gacaggcgtc	caggagctcc	1320

ES 2 692 773 T3

aaacctgtag aggacccagg agggcttcgg cagattccac ctataattct gtcttgctgg 1380
 tgtggataga aaccaggcag gacagtagat ccctatgggt ggatctcagc tggaagttct 1440
 gtttggagcc catttctgtg agaccctgta tttcaaattt gcagctgaaa ggtgcttcta 1500
 cctctgattt caccccagag ttggagttct gctcaaggaa cgtgtgtaat gtgtacatct 1560
 gtgtccatgt gtgaccatgt gtctgtgaag gccagggaac atgtattcct ctgcatgcat 1620
 gtatgtagggt gcctgggagt gtgtgtggtc cttgctctgg ccctttccct tgcaggggtg 1680
 tgcaggtgtg aataaa 1696

5 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 7
 ggaccatacc aaaggagat 19

15 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 8
 gcgtctttgg gaatccttt 19

25 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 9
 gcaggacagt agatccct 18

35 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 10
 gctcaaggaa cgtgtgtaa 19

45 <210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 11
 ccuuccaaag ccagaucuun n 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<220>

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

5 <400> 12
 gccugggcag gaacauauan n 21

<210> 13
 <211> 21
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 13
 20 ccugggcagg aacauuaun n 21

<210> 14
 <211> 21
 <212> ARN
 25 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 30 <223> n = desoxitimidina

<400> 14
 30 gguucauuau ggcuguguun n 21

<210> 15
 <211> 21
 35 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 15
 45 ggaccuauacc aaaggagaun n 21

<210> 16
 <211> 21
 <212> ARN
 50 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 55 <223> n = desoxitimidina

<400> 16
 60 gcgucuuugg gaaucuuun n 21

<210> 17
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

65 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 692 773 T3

<222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

 <400> 17
 5 gcaggacagu agauccuan n 21

 <210> 18
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 15 <223> n = desoxitimidina

 <400> 18
 gcucaaggaa cguguguaan n 21

 <210> 19
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

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

 <400> 19
 30 gtaagggatg tgaatcgggt actgangaaa gagcctggat gcagagccag c 51

 <210> 20
 <211> 51
 35 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

 <400> 20
 45 ttgataactt cagcatctgg atcacngtgg gattagcatc tgttgtatt t 51

 <210> 21
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T
 55

 <400> 21
 gtgtgattgc ttaaaaaaaaa ctactnecat tgtttgaat cacacctcac a 51

 <210> 22
 <211> 51
 60 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 65

ES 2 692 773 T3

<223> n = T o C
 <400> 22
 5 gctcagctaa tcaatgacca gtctcnttaa ttcttctaat gcctatatgg t 51
 <210> 23
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G
 15 <400> 23
 gcagtgtcga gaagagcagc agccantgac attttggggc tataagaggt a 51
 <210> 24
 20 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T
 <400> 24
 30 tgtccagtaa atacttaaca ttttangtgc aatgtatgac ataaatatgg g 51
 <210> 25
 <211> 51
 <212> ADN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 40 <223> n = G o A
 <400> 25
 gggtgaagtt tggaacagc tatacntgt gatgcaatcg tcagaaccaa g 51
 45 <210> 26
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T
 55 <400> 26
 aaaccatagt atcatccttc ccaaanagtc aaccagga atcacagaga t 51
 <210> 27
 <211> 51
 60 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

ES 2 692 773 T3

<400> 27
 taagacgcta ttctctaatt ctgaangгаа gaactcctct cccaagacat g 51

5 <210> 28
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

15 <400> 28
 aggtgгаа acacaaaggg tgggngagg cgtgcaattt aaacatttc t 51

20 <210> 29
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o A

30 <400> 29
 tattagattt tgtgtgggat ttcatngtta catttggtac cagccaatt t 51

35 <210> 30
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

45 <400> 30
 gattccagtt ccaagtcaca tcatncag ctggaagacc tagggcaaaa g 51

50 <210> 31
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G o A

60 <400> 31
 accatgacgg tgcctcatt gcttnacca ttagtaatca ttcattcatt c 51

65 <210> 32
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

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

ES 2 692 773 T3

<400> 32
 acctgtcaca tttgtcagc tccanccac ccctaccac tgtcctata a 51

5 <210> 33
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

15 <400> 33
 gacacgatgt cttcagtctc cagctnagct tggactgtga ggatgggtca g 51

20 <210> 34
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

30 <400> 34
 ctctcaagtt tgcccagggg atacngggga agtgcccctg gggggccgac c 51

35 <210> 35
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G o T

45 <400> 35
 ctggtctct ccagctctgg tggctnccag tatttctgg gttgtggcct c 51

50 <210> 36
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C

60 <400> 36
 aacaaggtga cagaccaggg agtaangcct ctcagtgatg ccttgagagt c 51

65 <210> 37
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

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

<400> 37

cggcaggcag taggatggac tgcgngacg gcggccagca tgtaaatgaa a 51

<210> 38
 <211> 51
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C

<400> 38
 15 aagtaagggtg tcaaggaggc catgncact ctgtaggttc taggaaagaa t 51

<210> 39
 <211> 51
 <212> ADN
 20 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C
 25

<400> 39
 atgcctgaaa gaaacaagag caaatngtct caggaggtag gtaataggat g 51

<210> 40
 30 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

<400> 40
 40 agcatattca ttgattcct tacatncaa tgctccttt taagtctca a 51

<210> 41
 <211> 51
 <212> ADN
 45 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G
 50

<400> 41
 tcagtacgta ttctgcac agtgctcct gcggtcctc caacagtcag c 51

<210> 42
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T
 60

<400> 42
 65 agtggaggcc ctggaacccg ggacngtga caattcacc gtgtgggcag a 51

ES 2 692 773 T3

<210> 43
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G
 10
 <400> 43
 tgccatataa ttcagggtg caacgnataa acaaggggtg atgccgaaga a 51
 <210> 44
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G o A
 20
 <400> 44
 25 ctctgtcccc tcaactctt tctacntggt catgtccctt cttagttcc t 51
 <210> 45
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o C
 35
 <400> 45
 gcaacaaaaa tcttatacat caccanattg ctgcttagcg gcagaattgc c 51
 40
 <210> 46
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G
 50
 <400> 46
 gctaggtaaa ggactctgaa aatacngcaa catggaaaac atccagtctc c 51
 <210> 47
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C
 60
 <400> 47
 tccattgccc cagtgcagca tagccngcat tgccaaggtg gtcttccaa c 51
 65
 <210> 48

ES 2 692 773 T3

<211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

10 <400> 48
 cgtttaacaa agaagacact gagatngagg gcctggaagt gccttcatt g 51

<210> 49
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

20 <400> 49
 ttctacgact ttttactgc ctacangagt cccaggagga agactcaca a 51

25 <210> 50
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G o T

35 <400> 50
 gccaaatgtg ttgaaaatt ccatngaag aatttatggt gaatgcatt t 51

40 <210> 51
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

50 <400> 51
 gaagattggt caagaaaagg cagagngcat gatgacaaca caaatgaag a 51

<210> 52
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G

60 <400> 52
 cctgggacta tccctggcc gggccncaca catgtgcct gtgaccagg a 51

65 <210> 53
 <211> 51

ES 2 692 773 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T

 <400> 53
 10 gctggctgtg aggagtccgc gagaantccc ttgctgtcc atgaattat c 51

 <210> 54
 <211> 51
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 20 <223> n = G o T

 <400> 54
 aaggatgaaga gtgggaaaag gcagangatc aggaaaaata actaatgggt a 51

 25 <210> 55
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o C

 35 <400> 55
 ggctaataa aaggaattag agagcncctc ctcctctcca acatctttt c 51

 <210> 56
 <211> 51
 40 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 45 <223> n = G o A

 <400> 56
 50 tggctgtgc tctccttgca cactcncctg tggacatcac aggagggaac a 51

 <210> 57
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o T
 60

 <400> 57
 gtcgtatat gtgttacaag tggctngtgt tgaccgcctg cctgtggaaa g 51

 <210> 58
 <211> 51
 <212> ADN
 65

ES 2 692 773 T3

<213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o C
 <400> 58
 10 gcctcgggtg ctgaccgggg gtgccnttgc tgggcttagc aggccgggct t 51
 <210> 59
 <211> 51
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 20 <223> n = A o G
 <400> 59
 tgatgtgcca catcctgtat aggaancagg tgatgtggaa atgagtcaga c 51
 <210> 60
 25 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = A o G
 <400> 60
 35 catgaaaacc cctcagatgg taccanaaat atagacaatt gatccagaga g 51
 <210> 61
 <211> 51
 <212> ADN
 40 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 45 <223> n = T o C
 <400> 61
 gtcccagcta ctcacacagg aggatngcag gagtttgaaa ccagcctgtg c 51
 50 <210> 62
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C
 60 <400> 62
 cacctcagg gcctctcct gaccntctc tcacccccgg gacctcctg c 51
 <210> 63
 <211> 51
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C
 5
 <400> 63
 gcaggtctgt gttccttgtt atgttncctt gctacaggca ctctcagcct t 51
 <210> 64
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = C o A
 15
 <400> 64
 gtcagtttgt gaacaggtaa aatcanaatg ctcatgttct ctacagggaa a 51
 <210> 65
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = G o A
 25
 <400> 65
 agccaattcg tcagtgatg aggcanagaa attggtaaaa agaaggaaag t 51
 <210> 66
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C
 35
 <400> 66
 tacatagtag gcttaagagc aatgnctac ctttcctct gtttcaact c 51
 <210> 67
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C
 45
 <400> 67
 gttggttggg ttgtttcccc ttaanggtg ccatttaatg acagatttca t 51
 <210> 68
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o G
 55
 <400> 67
 gttggttggg ttgtttcccc ttaanggtg ccatttaatg acagatttca t 51
 <210> 68
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 60
 <220>
 65

ES 2 692 773 T3

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

5 <400> 68
 gccccggtga caagaatggc aaaacnttta ttcggcatta acaatggtga a 51

<210> 69
 <211> 51
 10 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (26)..(26)
 <223> n = T o C

<400> 69
 20 gctcagctaa tcaatgacca gtctcnttaa ttcttctaat gcctatatgg t 51

<210> 70
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25

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

30

<400> 70
 gtaagggatg tgaatcgggt actgangaaa gagcctggat gcagagccag c 51

<210> 71
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35

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

40

<400> 71
 45 ttgataactc cagcatctgg atcacngtgg gattagcatc tgttgtatt t 51

<210> 72
 <211> 51
 <212> ADN
 50 <213> *Homo sapiens*

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

55

<400> 72
 gtgtgattgc ttaaaaaaaaa ctactnacat tgtttggaat cacacctcac a 51

60

<210> 73
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

65

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 692 773 T3

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

 <400> 73
 5 actgtgcca ggctggcttt gcaacnatga gcctgagaag ctgttagaag t 51

 <210> 74
 <211> 51
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 15 <223> n = A o G

 <400> 74
 gagacacaag aggtgggcag gtctnngga ttaggagtt gggttcaagg c 51

 <210> 75
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

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

 <400> 75
 30 tgagtctgtg aggagaaatg aacaantcta ccacagtcac ccagaatgag a 51

 <210> 76
 <211> 51
 <212> ADN
 35 <213> *Homo sapiens*

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

 <400> 76
 45 atcagaaggc taaggaacca cctgtntaat agtctggtgc caaacacagg c 51

 <210> 77
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

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

 <400> 77
 55 catcaataag aaaaacaaaa ataantntaat agaaaaatgc ataagagact t 51

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que es capaz de unirse a la interleucina 11 (IL-11) o al receptor α de IL-11 (IL-11R α) y de inhibir la señalización mediada por IL-11, para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis en un ser humano.
2. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es capaz de prevenir o de reducir la unión de IL-11 a un receptor de IL-11.
- 10 3. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de unión a IL-11.
- 15 4. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de unión a IL-11R α .
5. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la fibrosis es del corazón, el hígado, el riñón o los ojos.
- 20 6. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la fibrosis es en el corazón y está asociada a la disfunción de la musculatura o a las propiedades eléctricas del corazón o al engrosamiento de las paredes o de las válvulas del corazón.
- 25 7. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la fibrosis es en el hígado y está asociada a enfermedad hepática crónica o a cirrosis hepática.
- 30 8. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la fibrosis es en el riñón y está asociada enfermedad renal crónica.
- 35 9. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la fibrosis se encuentra en el ojo y es fibrosis retinal, fibrosis epirretinal o fibrosis subretinal.
- 40 10. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método de tratamiento o de prevención de la fibrosis comprende administrar dicho anticuerpo a un sujeto en el que la expresión de IL-11 o IL-11R está regulada positivamente.
- 45 11. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el método de tratamiento o de prevención de la fibrosis comprende administrar dicho anticuerpo a un sujeto en el que se ha determinado que la expresión de IL-11 o IL-11R está regulada positivamente.
- 50 12. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento o de prevención de la fibrosis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el método de tratamiento o de prevención de la fibrosis comprende determinar si la expresión de la IL-11 o del IL-11R está regulada positivamente en el sujeto y administrar dicho anticuerpo a un sujeto en el que la expresión de IL-11 o IL-11R está regulada positivamente.

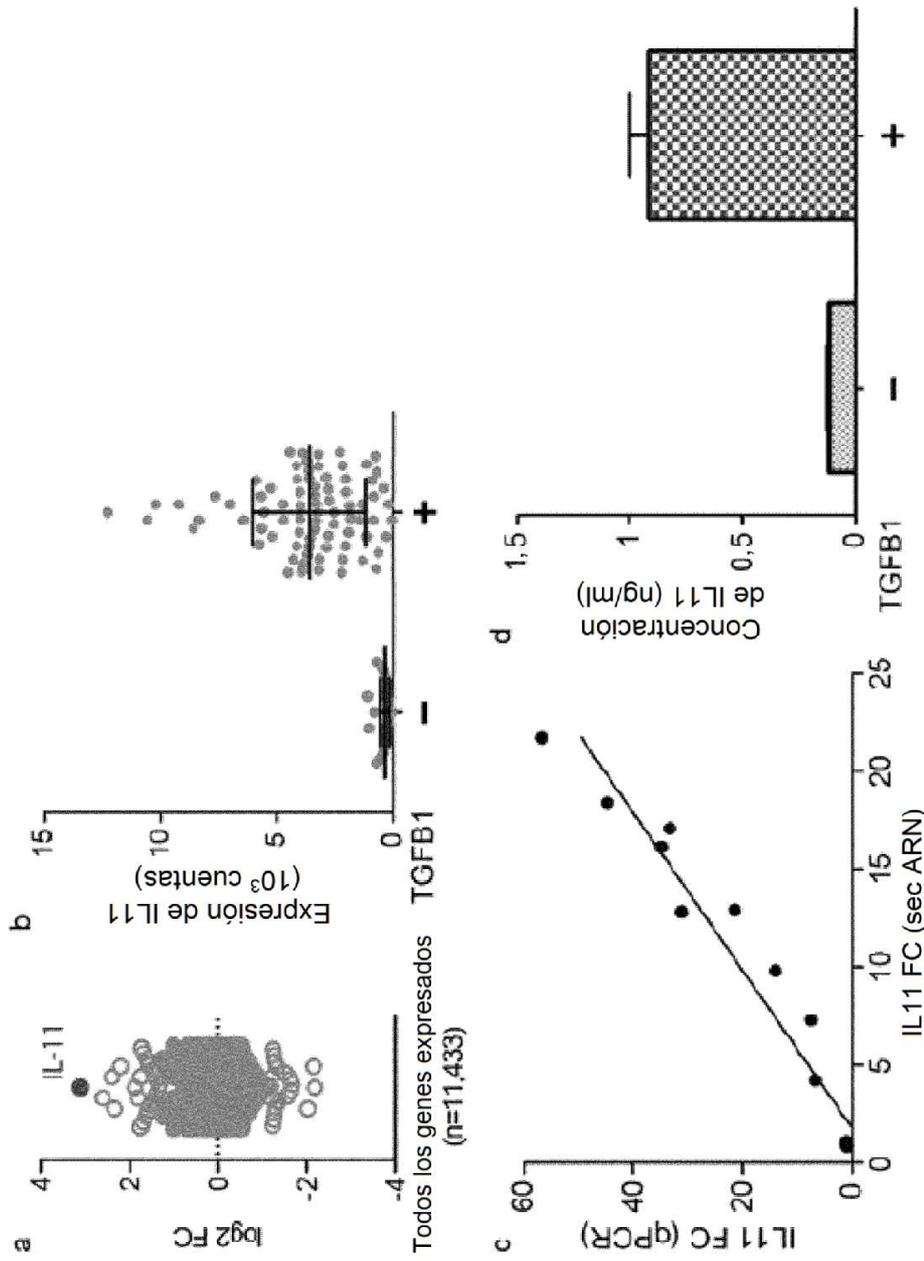


Figura 1

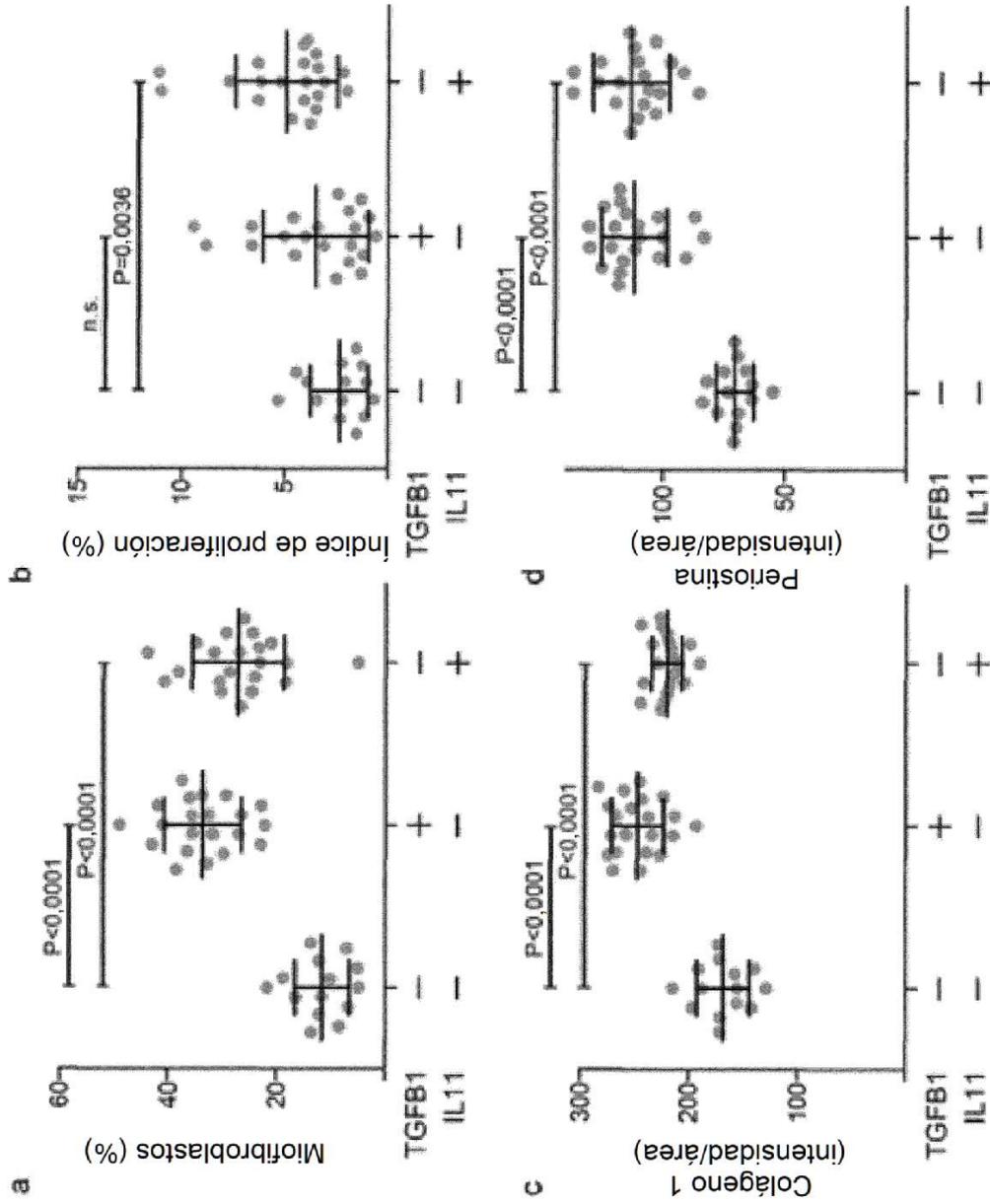


Figura 2

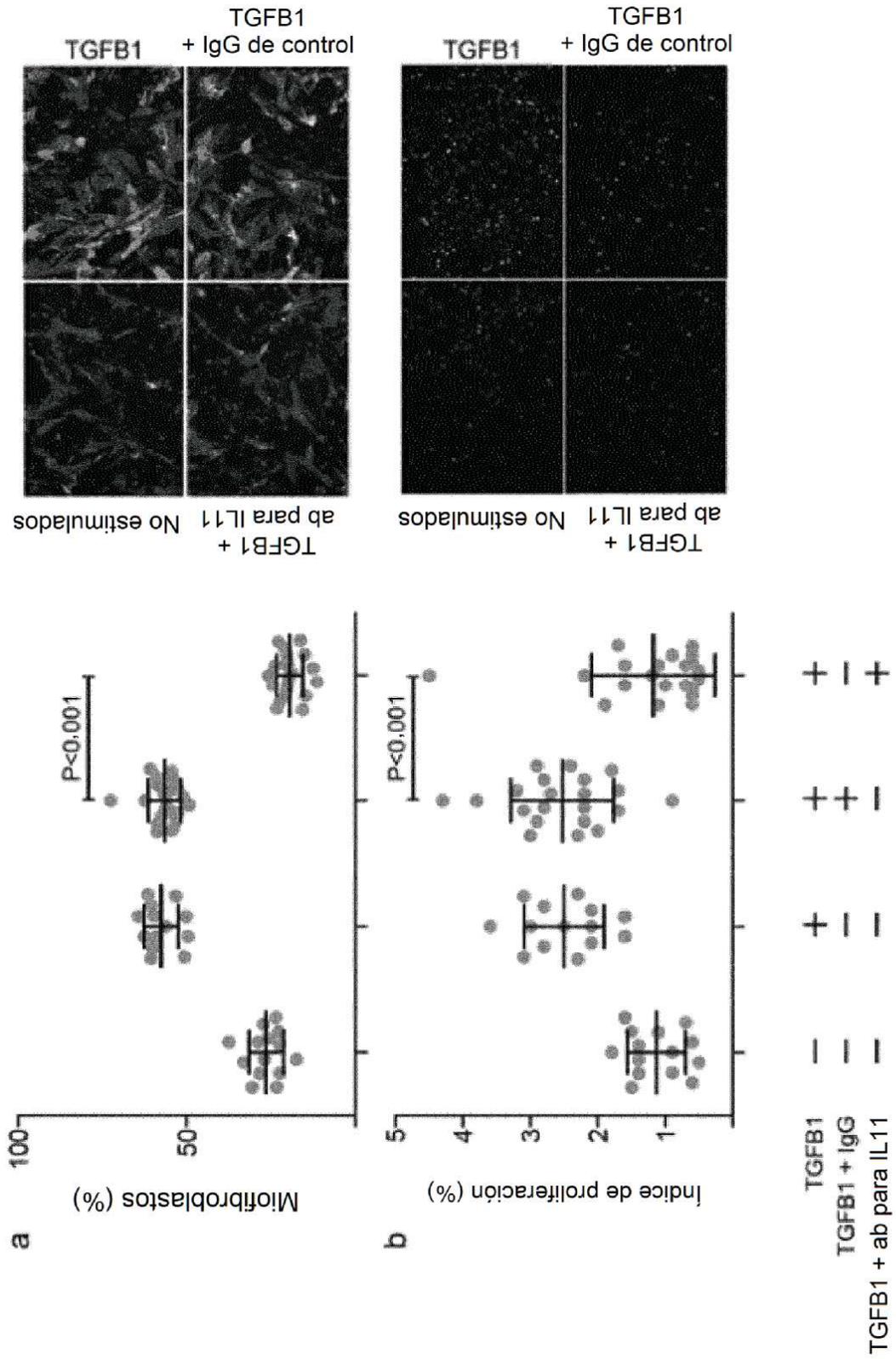


Figura 3a y 3b

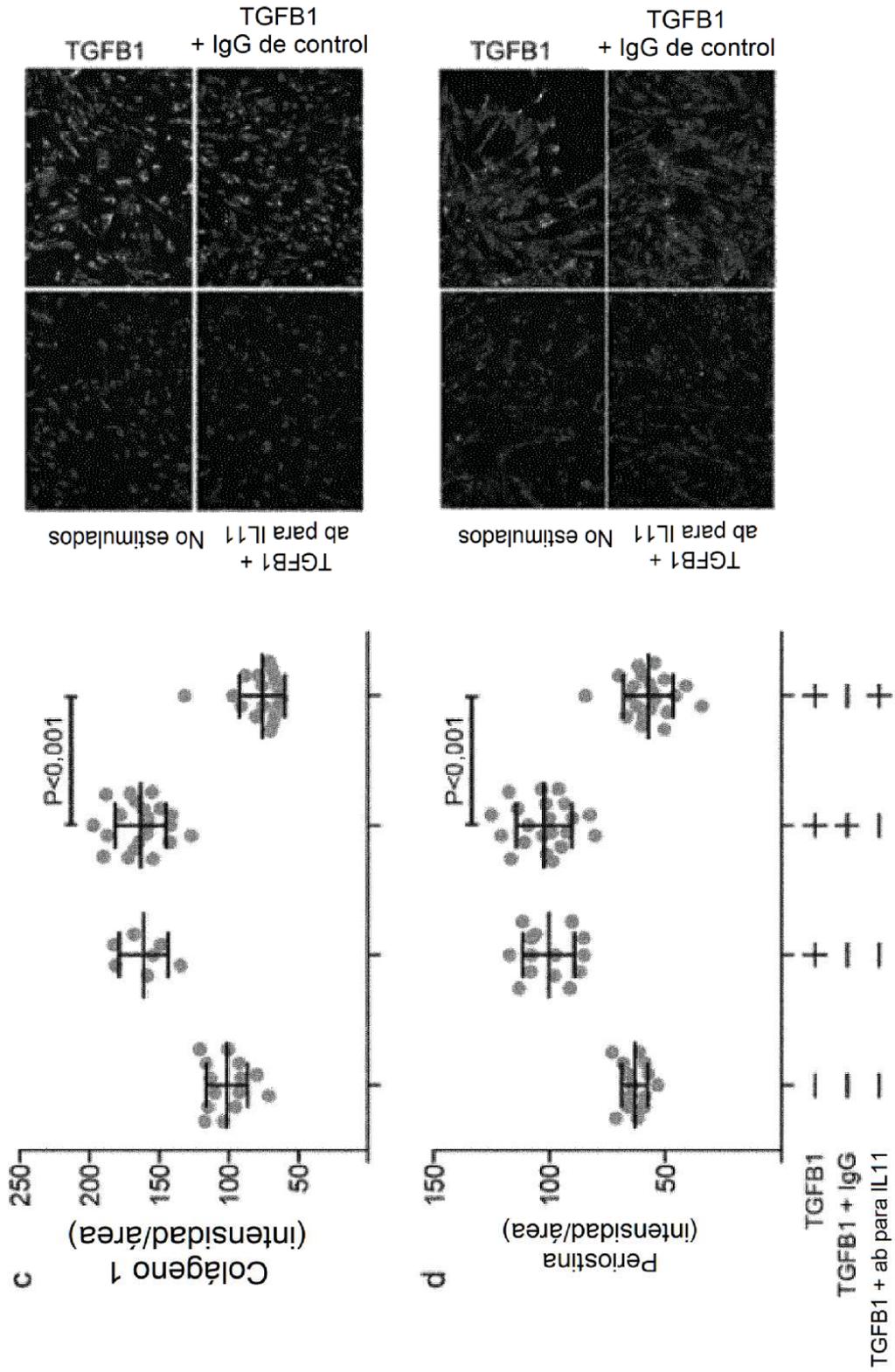


Figura 3c y 3d

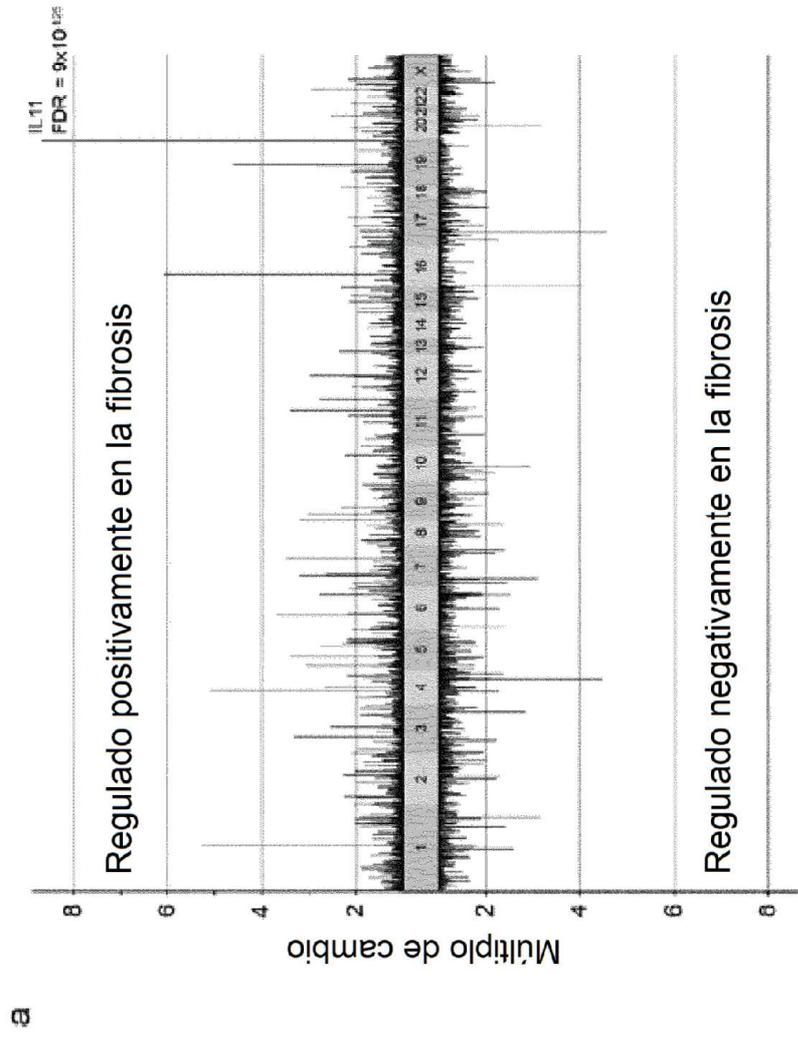


Figura 4a

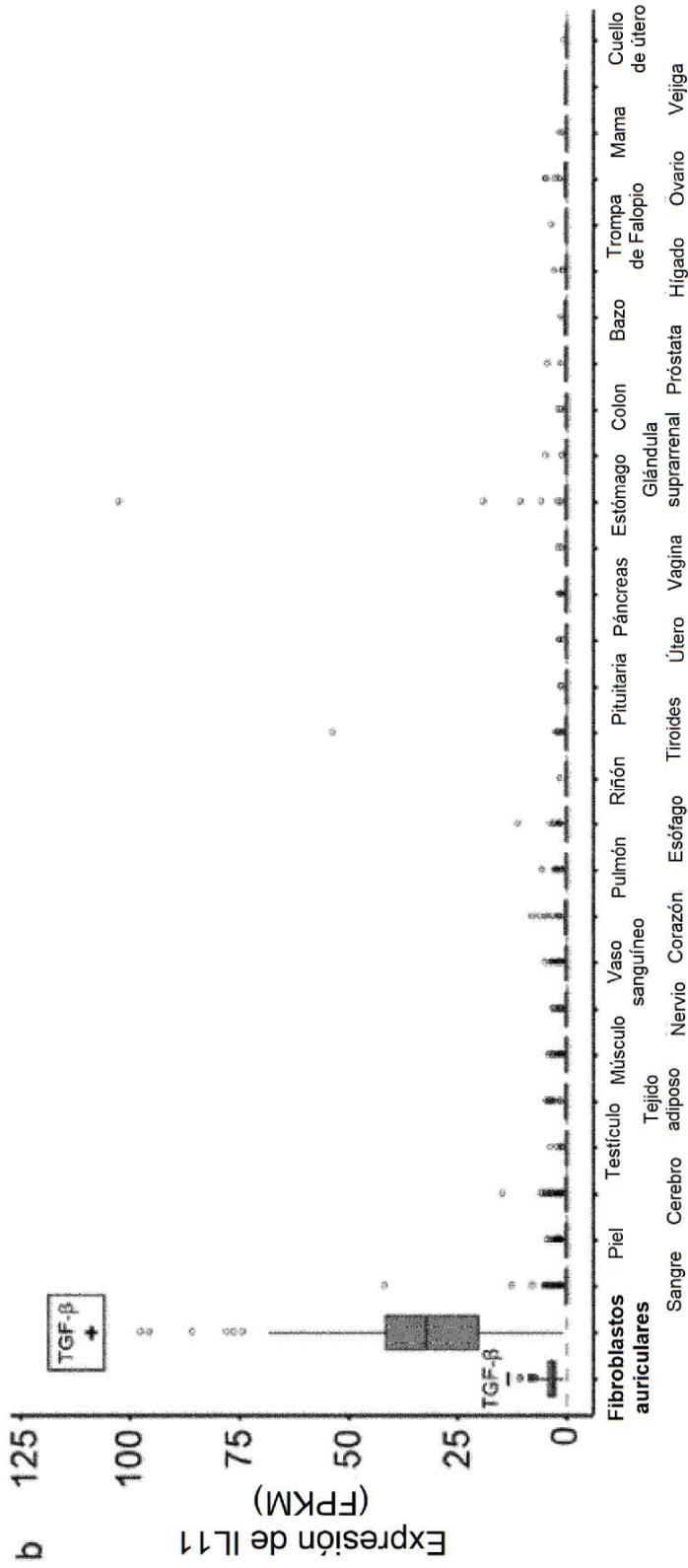


Figura 4b

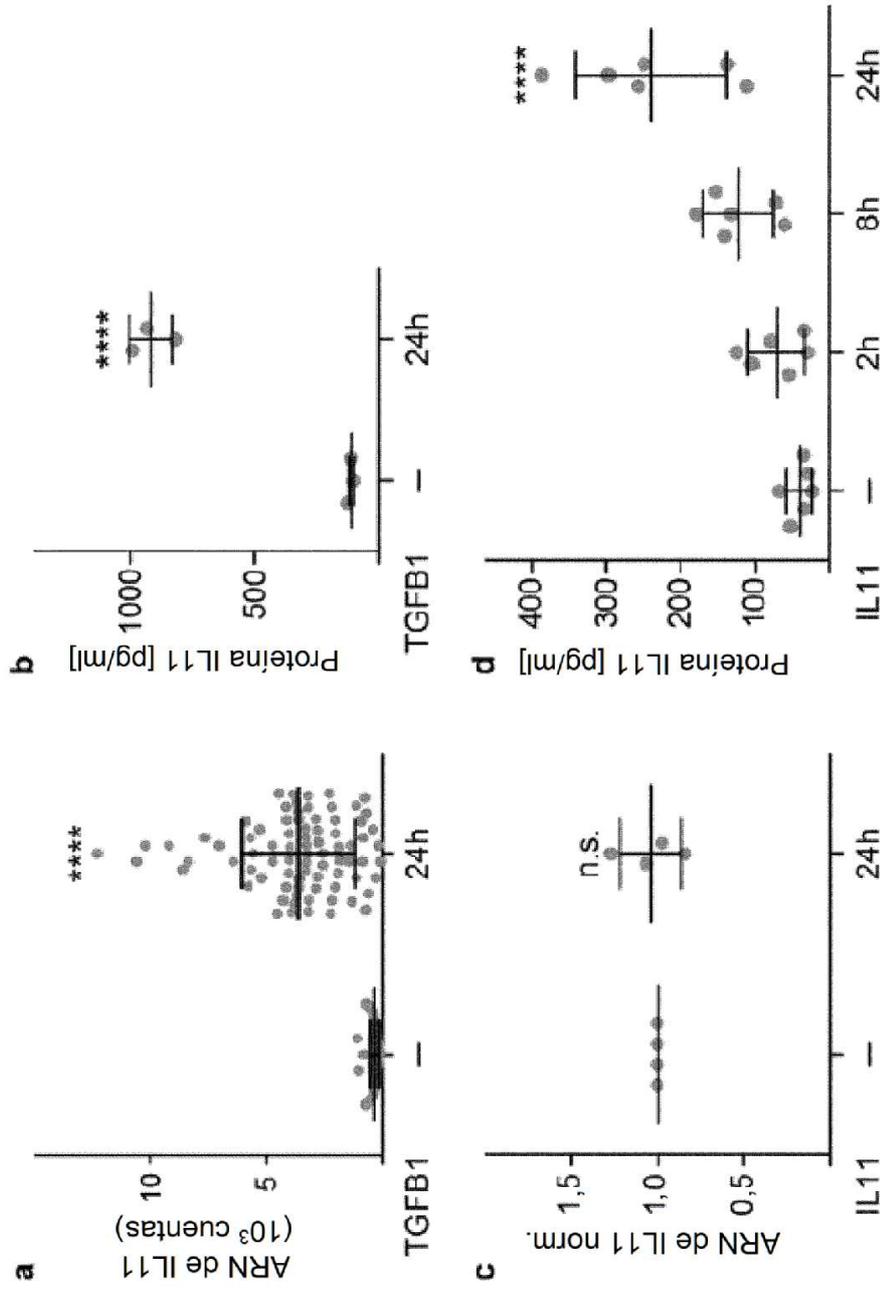


Figura 5

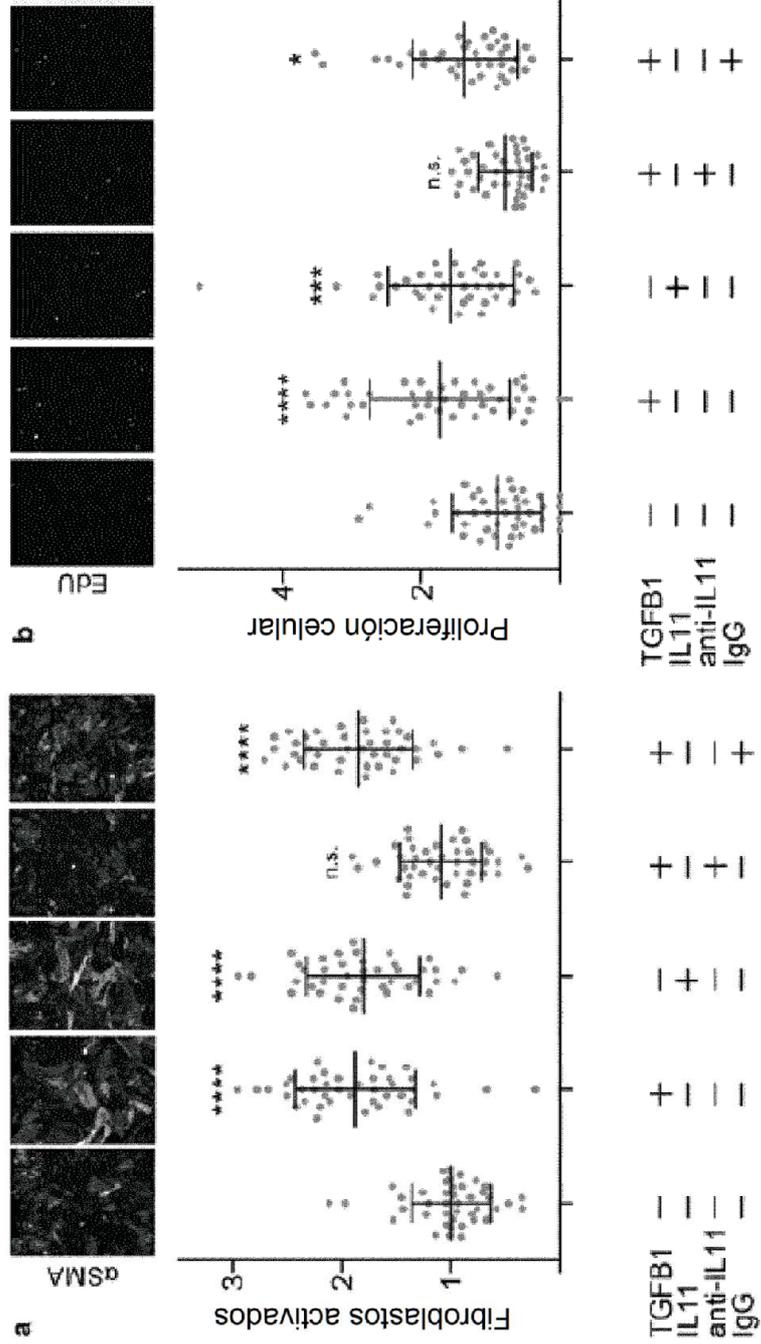


Figura 6a y 6b

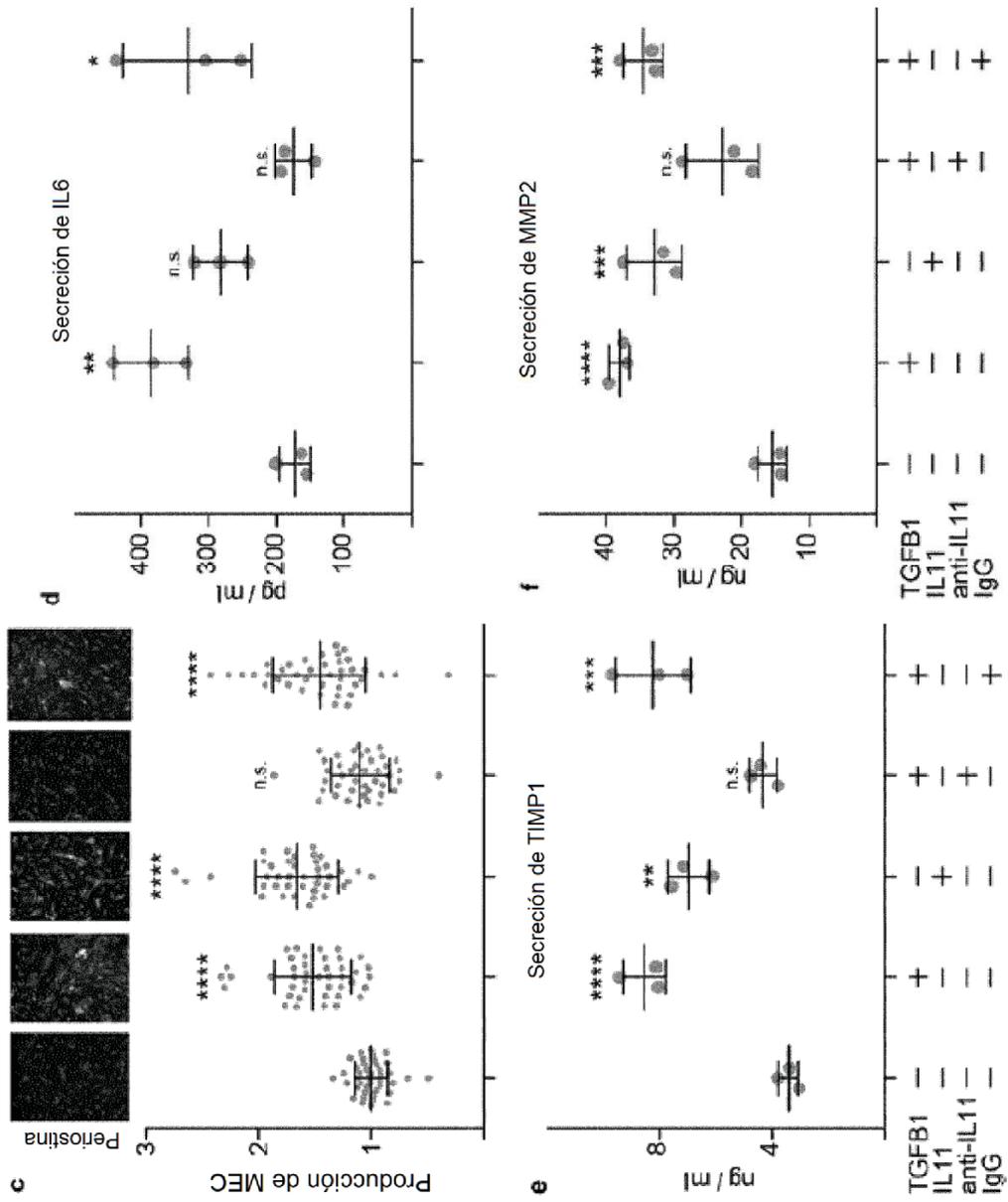


Figura 6c, 6d, 6e y 6f

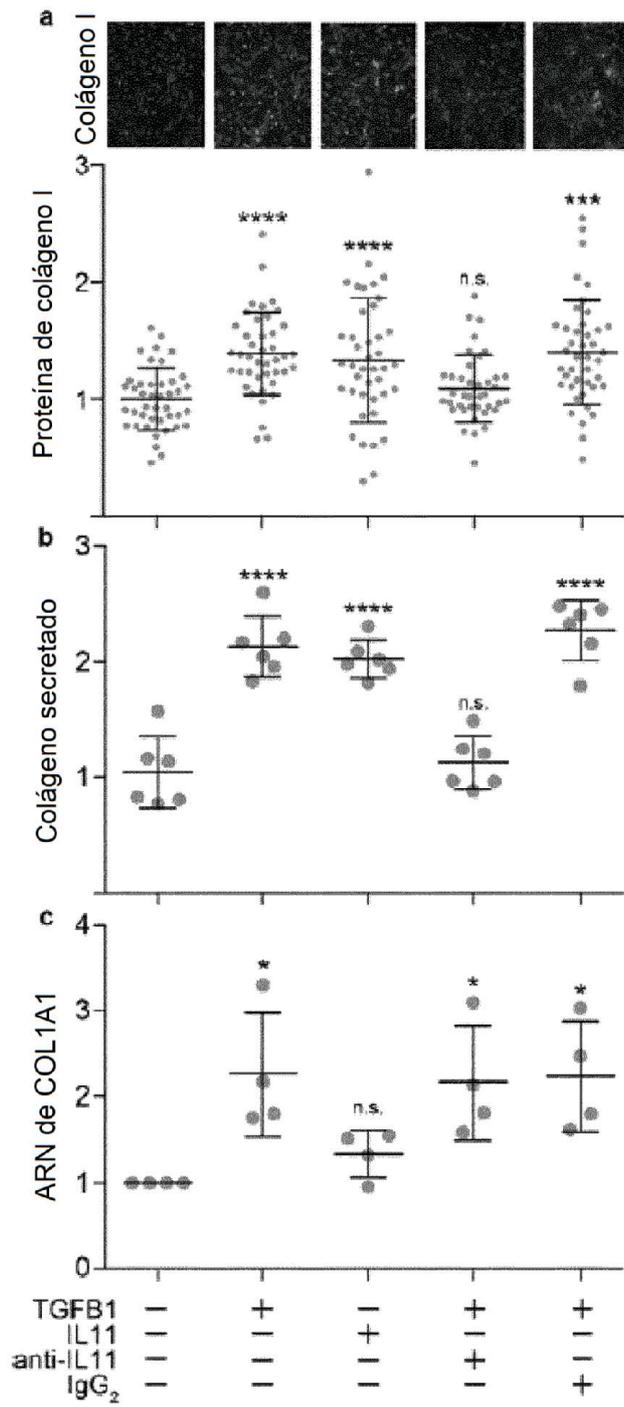


Figura 7

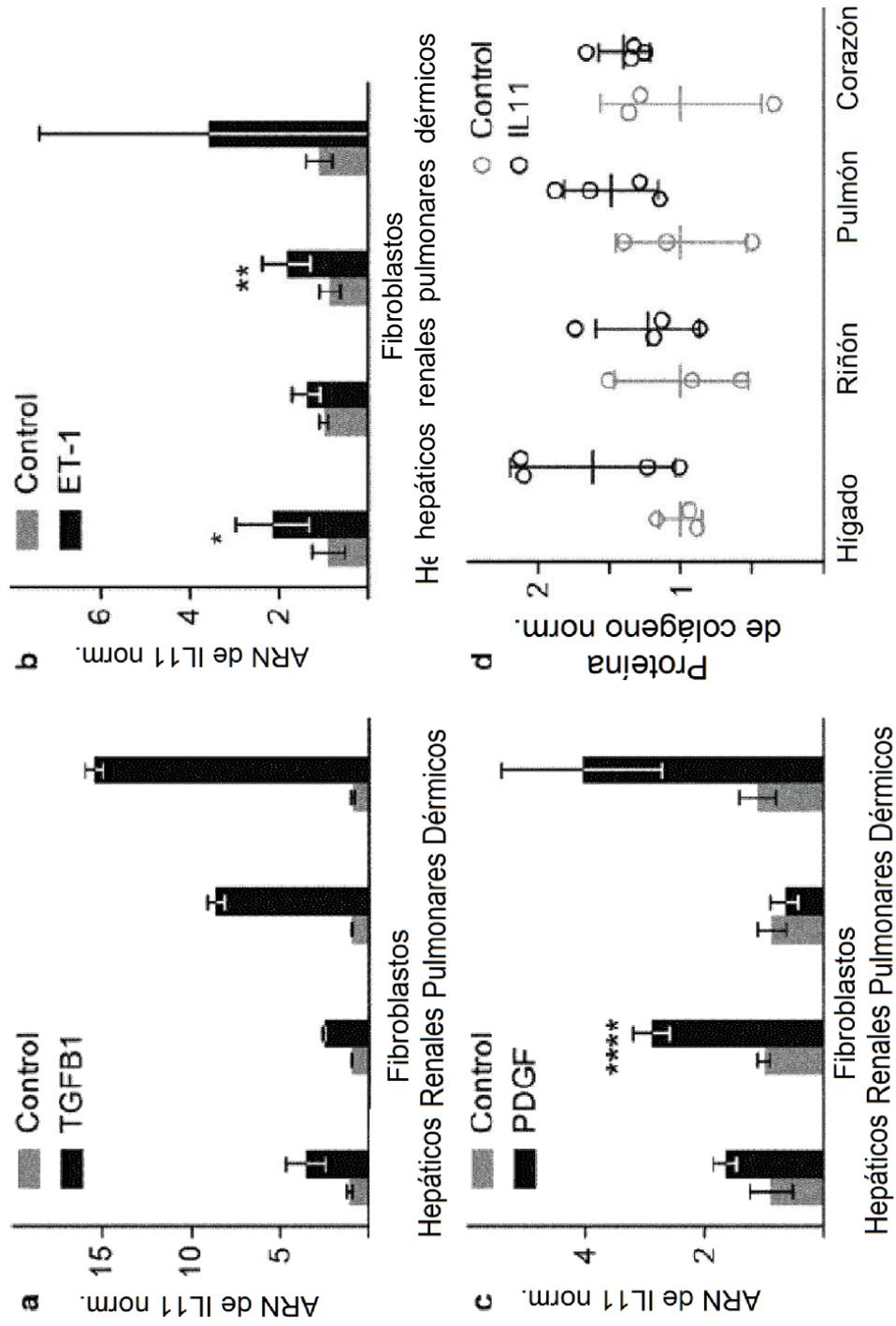


Figura 8a, 8b, 8c y 8d

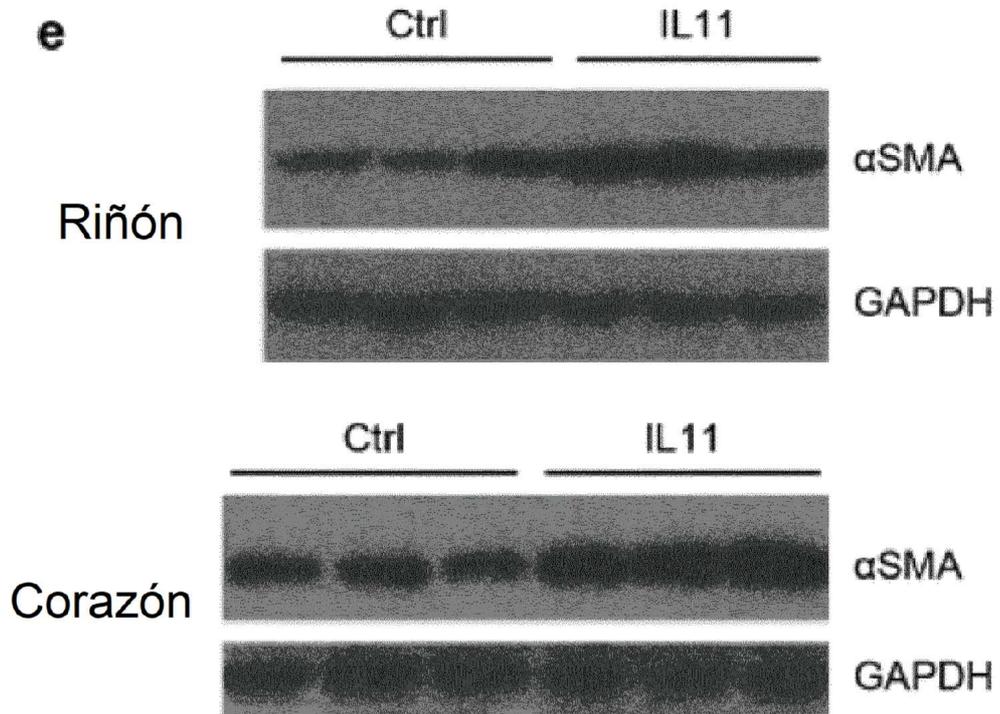


Figura 8e

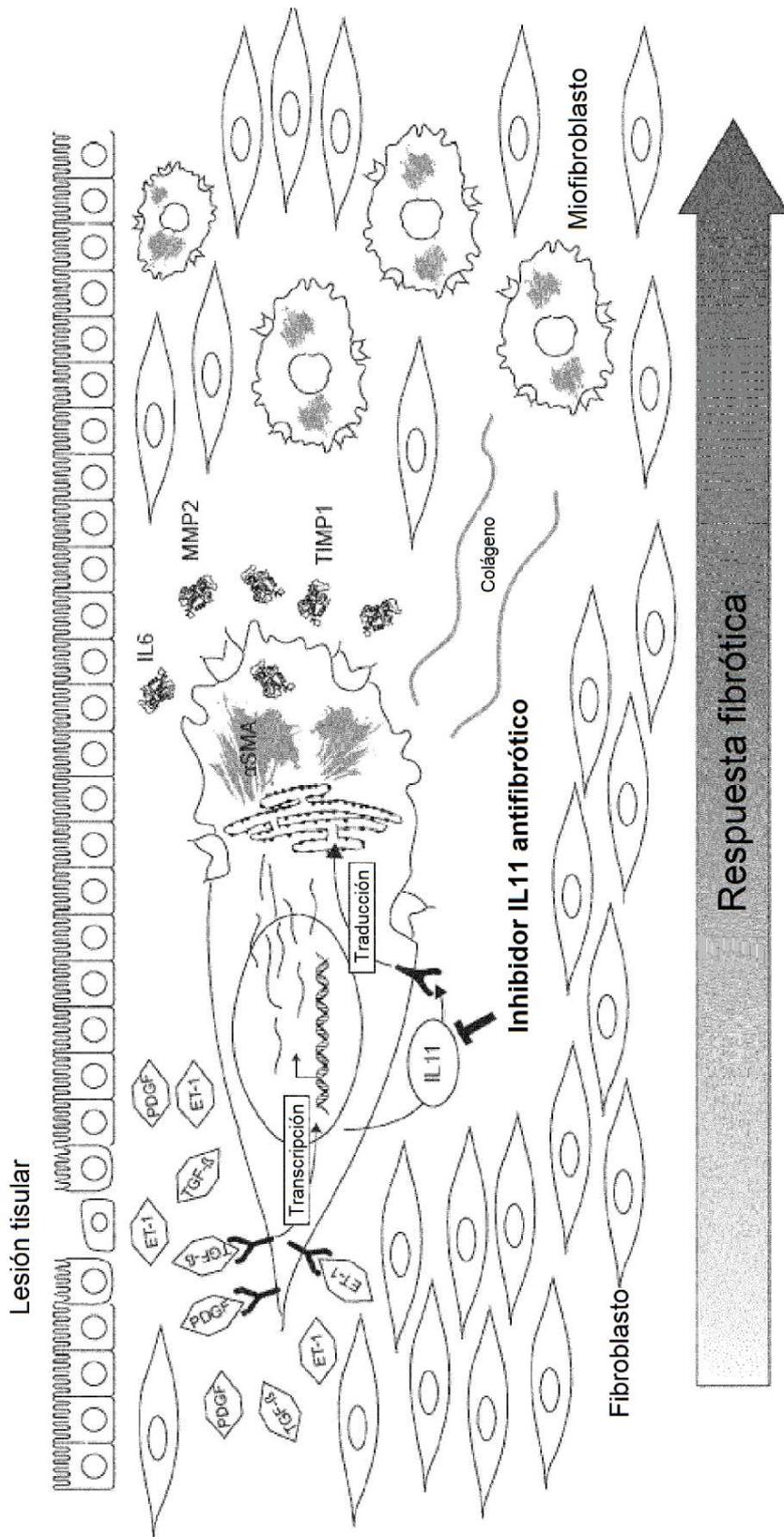


Figura 9

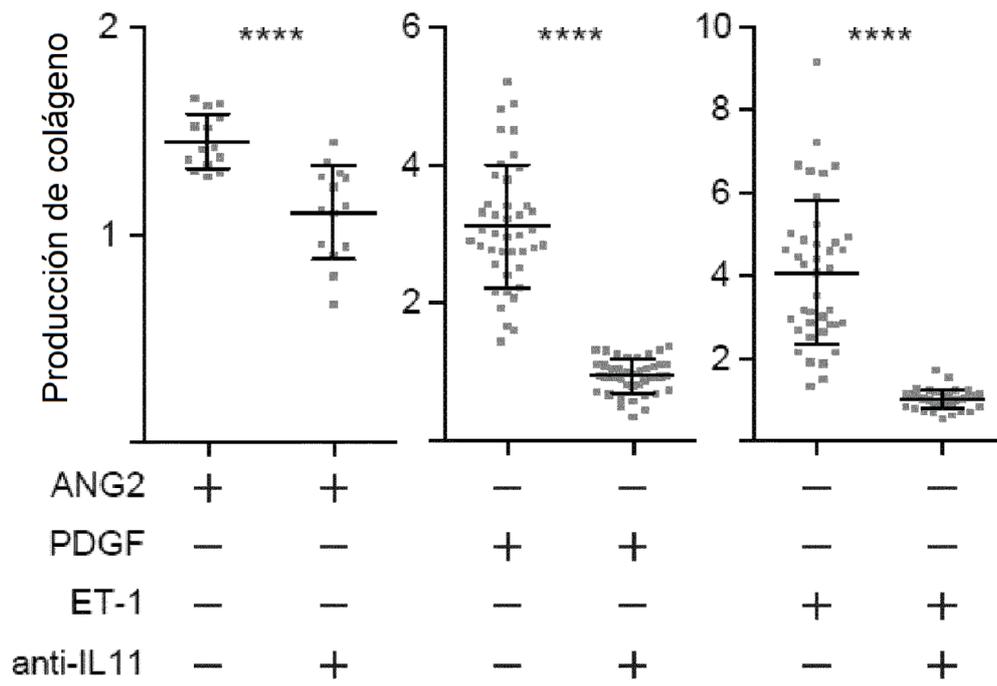


Figura 10

ES 2 692 773 T3

ACTGCCGCGGCCCTGCTGCTCAGGGCACATGCCTCCCCTCCCCAGGCCGCGGCCAGCTGACCCCTCGGGG
CTCCCCCGGCAGCGGACAGGGAAGGGTTAAAGGCCCCCGGCTCCCTGCCCCCTGCCCTGGGGAAACCCTG
GCCCTGTGGGGACATGAACTGTGTTTGCCGCCTGGTCTGGTCTGCTGAGCCTGTGGCCAGATACAGCT
GTCGCCCCCTGGGCCACCACCTGGCCCCCTCGAGTTTCCCCAGACCCCTGGGCCGAGCTGGACAGCACCG
TGCTCCTGACCCGCTCTCTCCTGGCGGACACGCGGCAGCTGGCTGCACAGCTGAGGGACAAAATCCCAGC
TGACGGGGACCACAACCTGGATTCCCTGCCACCCTGGCCATGAGTGCAGGGGGCACTGGGAGCTCTACAG
CTCCCAGGTGTGCTGACAAGGCTGCGAGCGGACCTACTGTCTACCTGCGGCACGTGCAGTGGCTGCGCC
GGGAGGTGGCTCTTCCCTGAAGACCCCTGGAGCCCGAGCTGGGCACCCTGCAGGCCGACCTGGACCCGCT
GCTGCGCCGGCTGCAGCTCCTGATGTCCCGCCTGGCCCTGCCCCAGCCACCCCGGACCCCGCGGCCGCC
CCGCTGGCGCCCCCTCCTCAGCCTGGGGGGCATCAGGGCCGCCACGCCATCCTGGGGGGCTGCACC
TGACACTTGACTGGGCCGTGAGGGGACTGCTGCTGCTGAAGACTCGGCTGTGACCCGGGGCCAAAGCCA
CCACCGTCTTCCAAAGCCAGATCTTATTTATTTATTTATTTTTCAGTACTGGGGGCGAAACAGCCAGGTGA
TCCCCCGCCATTATCTCCCCCTAGTTAGAGACAGTCTTCCGTGAGCCTGGGGGGCATCTGTGCCTTA
TTTATACTTATTTATTTTTCAGGAGCAGGGGTGGGAGGCAGGTGGACTCCTGGGTCCCCGAGGAGGAGGGGA
CTGGGGTCCCGGATTCTTGGGTCTCCAAGAAGTCTGTCCACAGACTTCTGCCCTGGCTCTCCCCATCTA
GGCCTGGGCAGGAACATATATATTTATTTAAGCAATTACTTTTCATGTTGGGGTGGGGACGGAGGGGAA
AGGGAAGCCTGGGTTTTTTGTACAAAAATGTGAGAAACCTTTGTGAGACAGAGAACAGGGAATTAATGTG
TCATACATATCCACTTGAGGGCGATTTGTCTGAGAGCTGGGGCTGGATGCTTGGGTAACGGGGCAGGGC
AGGTGGAGGGGAGACCTCCATTGAGGTGGAGGTCCCAGTGGGCGGGCAGCGACTGGGAGATGGGTGCG
TCACCCAGACAGCTCTGTGGAGGCAGGGTCTGAGCCTTGCCCTGGGGCCCCGACTGCATAGGGCCTTTTG
TTTTTTTTTTGAGATGGAGTCTCGCTCTGTGCCTAGGCTGGAGTGCAGTGAGGCAATCTGAGGTCACTG
CAACCTCCACCTCCCGGGTTCAAGCAATTCCTGCCTCAGCCTCCCGATTAGCTGGGATCACAGGTGTG
CACCACCATGCCCAGCTAATTATTTATTTCTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATGTTGGC
CAGGCTGGTTTTGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCTCCTGCCTCGGCTCCCAAAGTGTGGGATTACAG
GTGTGAGCCACCACACTGACCCATAGGTCTTCAATAAATATTTAATGGAAGGTTCCACAAGTCACCCCTG
TGATCAACAGTACCCGTATGGGACAAAGCTGCAAGGTCAAGATGGTTCATTATGGCTGTGTTTACCATAG
CAAACCTGGAACAATCTAGATATCCAACAGTGAGGGTTAAGCAACATGGTGCATCTGTGGATAGAACGCC
ACCCAGCCGCCCGGAGCAGGGACTGTCATTGAGGAGGCTAAGGAGAGAGGCTTGCTTGGGATATAGAAA
GATATCCTGACATTGGCCAGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCTGGCACTTTGGGAGGACGAAGCGAG
TGGATCACTGAAGTCCAAGAGTTCGAGACCCGGCTGCGAGACATGGCAAAAACCTGTCTCAAAAAAGAAA
GAATGATGTCTGACATGAAACAGCAGGCTACAAAACCACTGCATGCTGTGATCCCAATTTTGTGTTTTT
CTTTCTATATATGGATTAACAAACAAAATCCTAAAGGGAAATACGCCAAAATGTTGACAATGACTGTCTCC
AGGTCAAAGGAGAGAGGTGGGATTTGGGTGACTTTTAAATGTGTATGATTGTCTGATTTTTACAGAATTT
CTGCCATGACTGTGTATTTTGCATGACACATTTTAAAAATAATAAACACTATTTTTTAGAATAACAGAAAA
A [SEQ ID NO:1]

CCTTCCAAAGCCAGATCTT [SEQ ID NO:2]

GCCTGGGCAGGAACATATA [SEQ ID NO:3]

CCTGGGCAGGAACATATAT [SEQ ID NO:4]

GGTTCATTATGGCTGTGTT [SEQ ID NO:5]

Figura 11

ES 2 692 773 T3

GCTGTAGCTGGTGAGAGGAAGTCCTAGAGGCTATGGACACTCTGCTGCTGGGATCACCGAGATGAGCAGC
AGCTGCTCAGGGCTGAGCAGGGTCCCTGGTGGCCGTGGCTACAGCCCTGGTGTCTGCCTCCTCCCCCTGCC
CCCAGGCCTGGGGCCCCCAGGGTCCAGTATGGGCAGCCAGGGAGGTCCGTGAAGCTGTGTGTCCTGG
AGTGACTGCCGGGACCCAGTGTCTGGTTTCGGGATGGGGAGCCAAAGCTGCTCCAGGGACCTGACTCT
GGGCTAGGGCATGAACTGGTCTGGCCAGGCAGACAGCACTGATGAGGGCACCTACATCTGCCAGACCC
TGGATGGTGCACCTGGGGGCACAGTGACCCTCAGCTGGGCTACCCTCCAGCCCGCCCTGTTGTCTCCTG
CCAAGCAGCCGACTATGAGAACTTCTCTTGCACTTGGAGTCCCAGCCAGATCAGCGGTTTACCCACCCGC
TACCTCACCTCCTACAGGAAGAAGACAGTCTAGGAGCTGATAGCCAGAGGAGGTCCATCCACAGGGC
CCTGGCCATGCCACAGGATCCCCTAGGGGCTGCCCGCTGTGTTGTCCACGGGGCTGAGTCTTGAGCCA
GTACCGGATTAATGTGACTGAGGTGAACCCACTGGGTGCCAGCACACGCCTGCTGGATGTGAGCTTGCAG
AGCATCTTGCGCCCTGACCCACCCAGGGCTGCGGGTAGAGTCAGTACCAGGTTACCCCGACGCCTGC
GAGCCAGCTGGACATAACCTGCCTCCTGGCCGTGCCAGCCCACTTCTGCTCAAGTTCCGTTTGCAGTA
CCGTCCGGCGCAGCATCCAGCCTGGTCCACGGTGGAGCCAGCTGGACTGGAGGAGGTGATCACAGATGCT
GTGGCTGGGCTGCCCATGCTGTACGAGTCAGTGCCCGGGACTTCTAGATGCTGGCACCTGGAGCACCT
GGAGCCCGGAGGCCTGGGGAACCTCCGAGCACTGGACCATAACCAAAGGAGATACCAGCATGGGGCCAGCT
ACACAGCAGCCAGAGGTGGAGCCTCAGGTGGACAGCCCTGCTCCCAAGGCCCTCCCTCCAACCACAC
CCTCGGCTACTTGATCACAGGGACTCTGTGGAGCAGGTAGCTGTGCTGCCGCTTTGGGAATCCTTCTT
TCCTGGGACTGGTGGCTGGGGCCCTGGCACTGGGGCTCTGGCTGAGGCTGAGACGGGGTGGGAAGGATGG
ATCCCCAAAGCCTGGGTCTTGGCCTCAGTGATTCCAGTGGACAGGCGTCCAGGAGCTCCAAACCTGTAG
AGGACCCAGGAGGGCTTCGGCAGATTCCACCTATAATTCTGTCTTGTGCTGGTGTGGATAGAAACCAGGCAG
GACAGTAGATCCCTATGTTGGATCTCAGCTGGAAGTCTGTTTGGAGCCATTTCTGTGAGACCCTGTA
TTTCAAATTTGCAGCTGAAAGGTGCTTGTACTCTGATTTACCCCAAGGTGGAGTTCTGCTCAAGGAA
CGTGTGTAAATGTGTACATCTGTGTCCATGTGTGACCATGTGTCTGTGAAGGCCAGGGAACATGTATTCT
CTGCATGCATGTATGTAGGTGCCTGGGAGTGTGTGTGGTCTTGTCTTGCCCTTTCCCTTGCAGGGTTG
TGCAGGTGTGAATAAA [SEQ ID NO:6]

GGACCATAACCAAAGGAGAT [SEQ ID NO:7]

GCGTCTTTGGGAATCCTTT [SEQ ID NO:8]

GCAGGACAGTAGATCCCT [SEQ ID NO:9]

GCTCAAGGAACGTGTGTAA [SEQ ID NO:10]

Figura 12

<i>Nombre del gen</i>	<i>ID del gen/n.º de referencia</i>	<i>Nombre del ARNpi</i>	<i>Secuencia del ARNpi</i>	<i>SEQ ID NO:</i>
IL-11	NM_000641.3	ARNpi 1	CCUCCAAAAGCCAGAUUUdTdT AAGAUCUGGCCUUUGGAAGGdTdT	11
IL-11	NM_000641.3	ARNpi 2	GCCUGGCAGGAACAUAUAdTdT UAUAUGUUCCCGCCAGGCdTdT	12
IL-11	NM_000641.3	ARNpi 3	CCUGGCAGGAACAUAUAdTdT AUAUAUGUUCCCGCCAGGCdTdT	13
IL-11	NM_000641.3	ARNpi 4	GGUUCAUUAUGGCCUGUGUUdTdT AACACAGCCAUAAUGAACCCdTdT	14

Figura 13

<i>Nombre del gen</i>	<i>ID del gen/n.º de referencia</i>	<i>Nombre del ARNpi</i>	<i>Secuencia del ARNpi</i>	<i>SEQ ID NO:</i>
IL-11R	U32324.1	ARNpi 5	GGACCAUACCAAAGGAGAUdT AUCUCCUUUGGU AUGGUCCdT	15
IL-11R	U32324.1	ARNpi 6	GCGUCUUUGGAAUCCUUdT AAAGGAUCCCAAAGACGCdT	16
IL-11R	U32324.1	ARNpi 7	GCAGGACAGUAGAUCCCUAdT UAGGGAUCUACUGUCCUGCdT	17
IL-11R	U32324.1	ARNpi 8	GCUCAAGGAACGUGUGUAAAdT UUACACACGUUCCUUGAGCdT	18

Figura 14

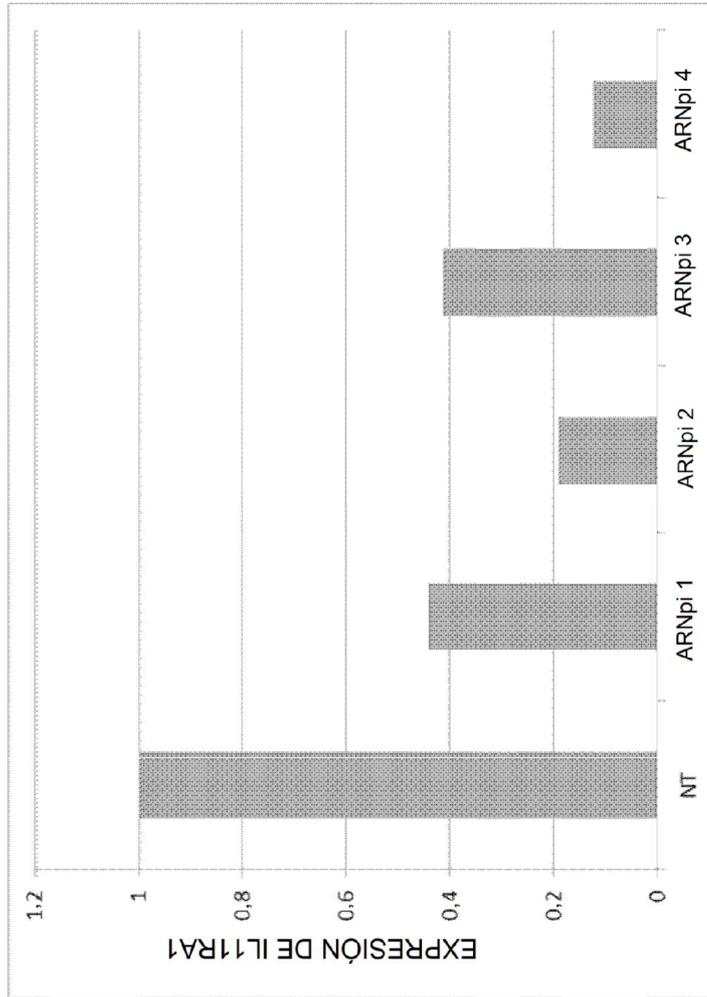


Figura 15

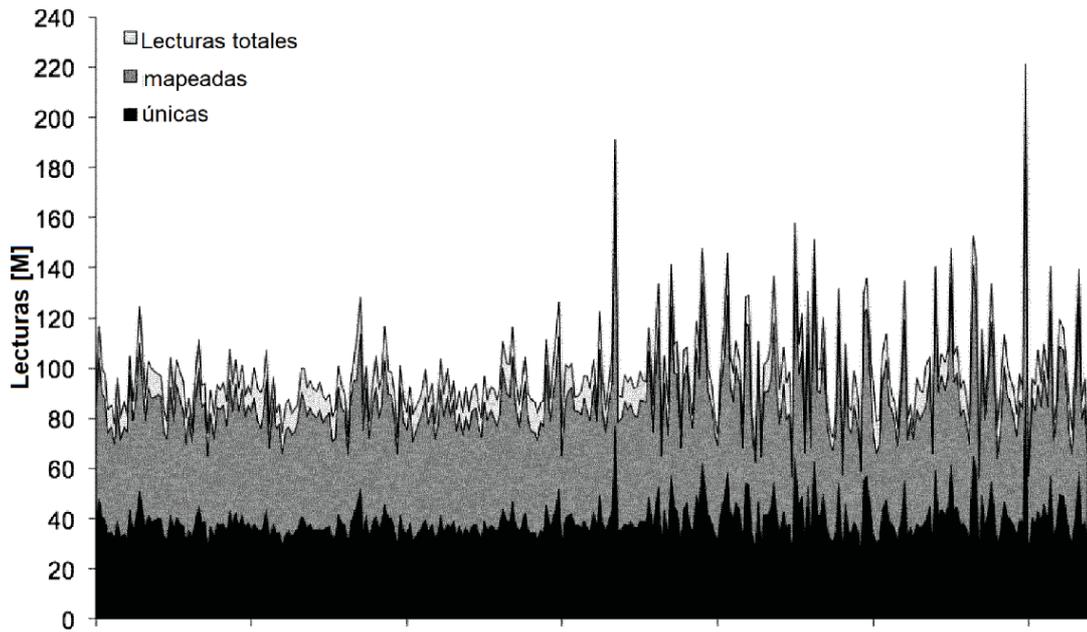


Figura 16

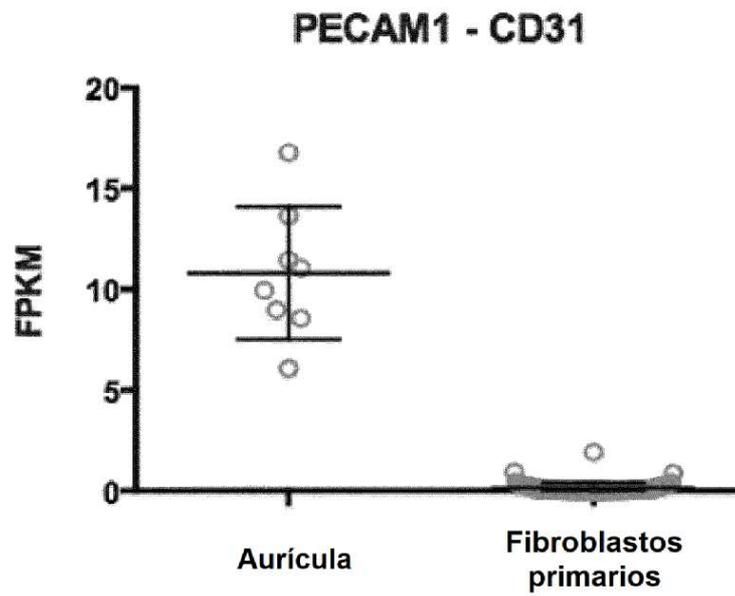


Figura 17A

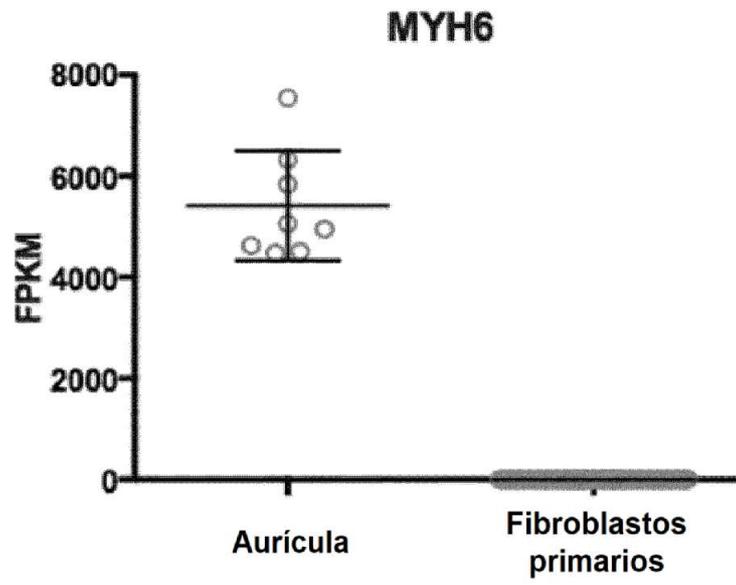


Figura 17B

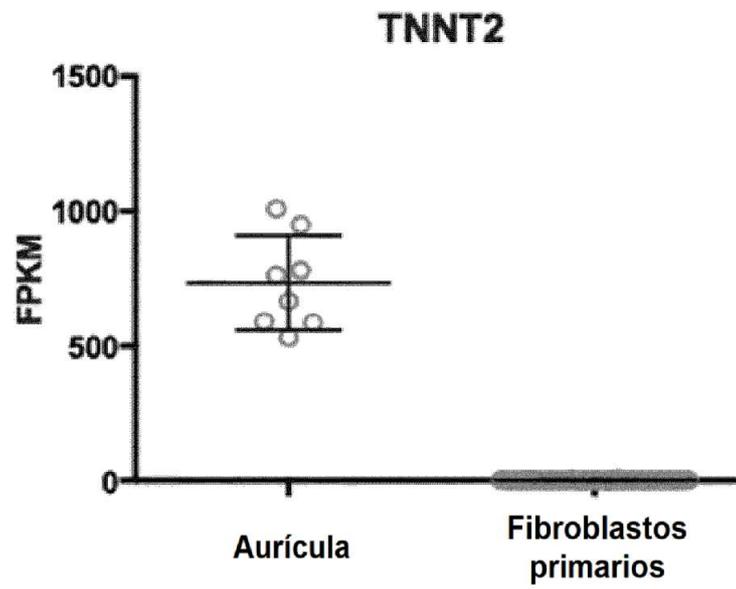


Figura 17C

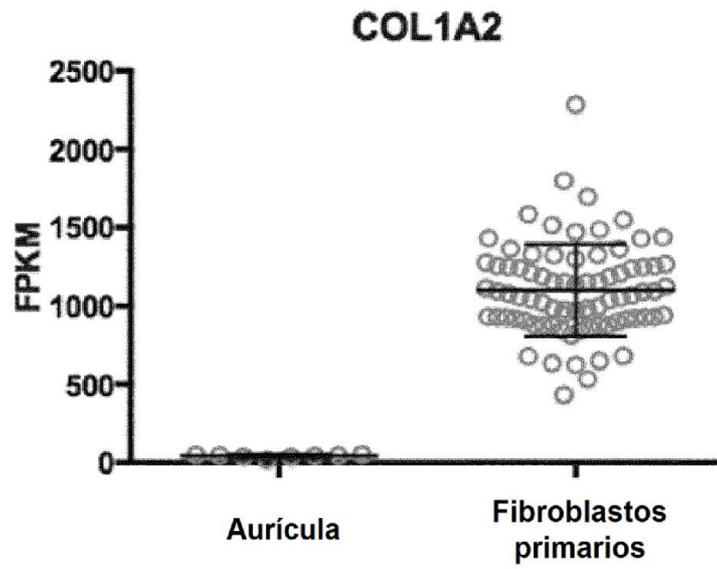


Figura 17D

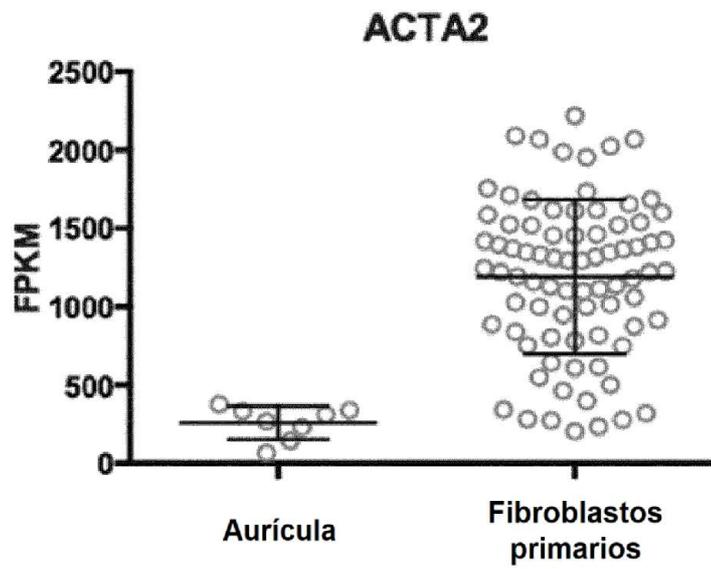


Figura 17E

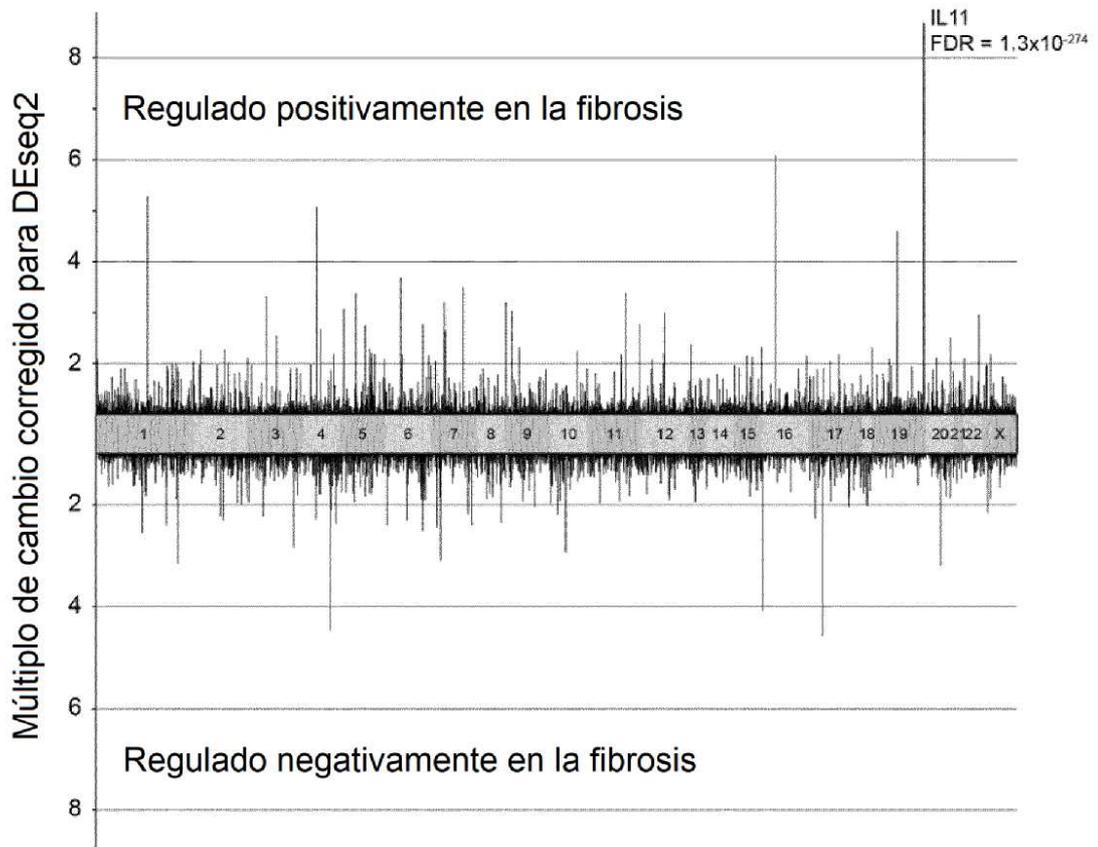


Figura 18A

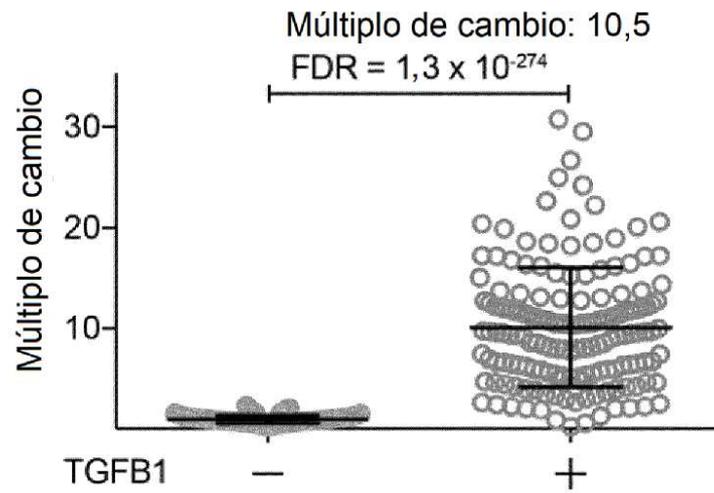


Figura 18B

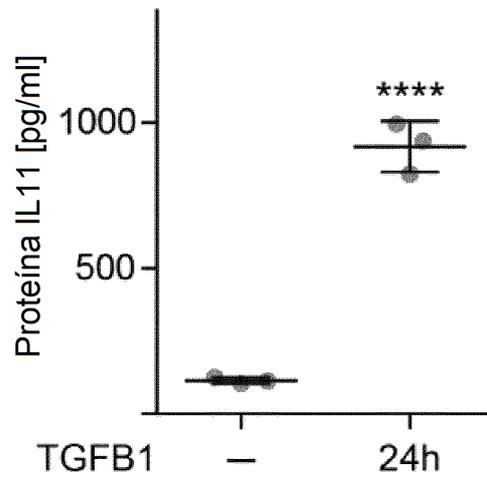


Figura 18C

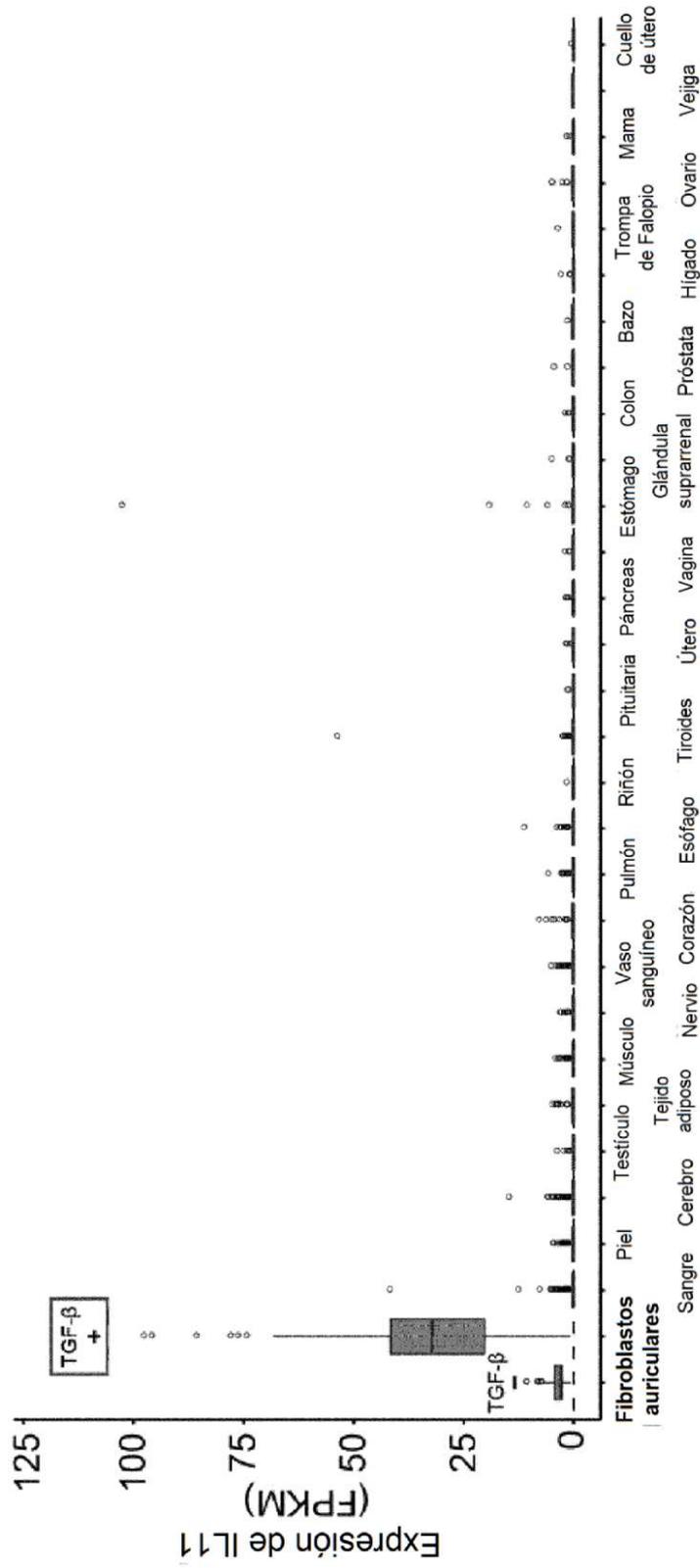


Figura 18D

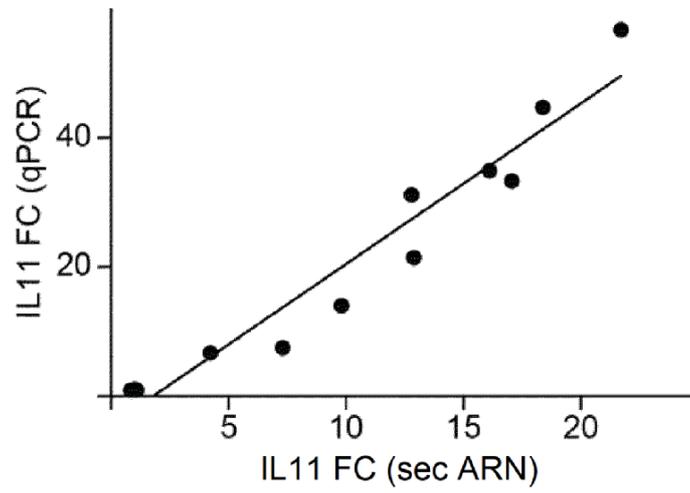


Figura 18E

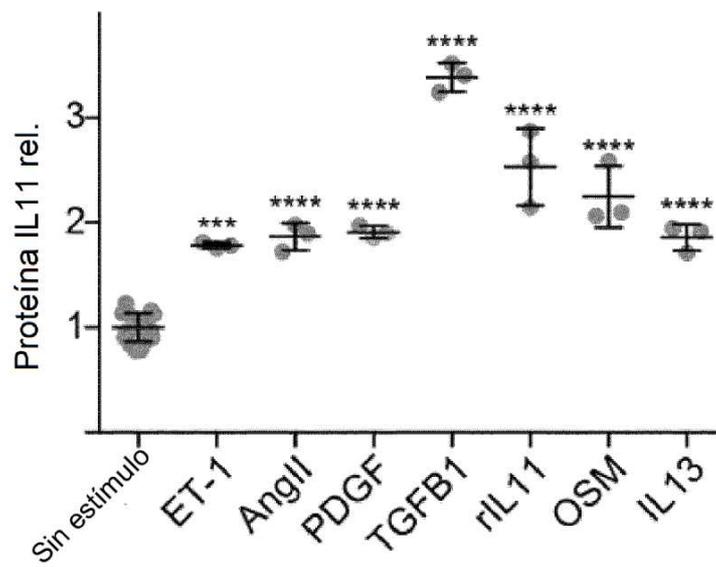


Figura 19A

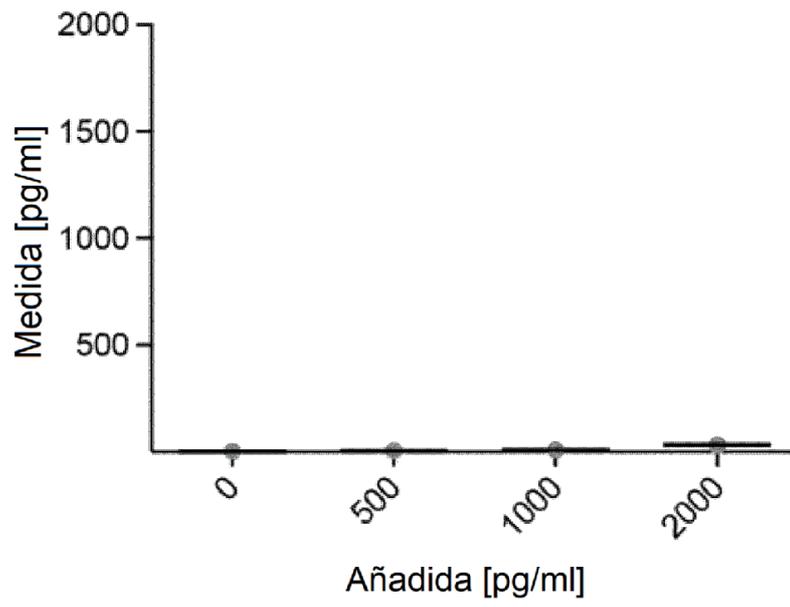


Figura 19B

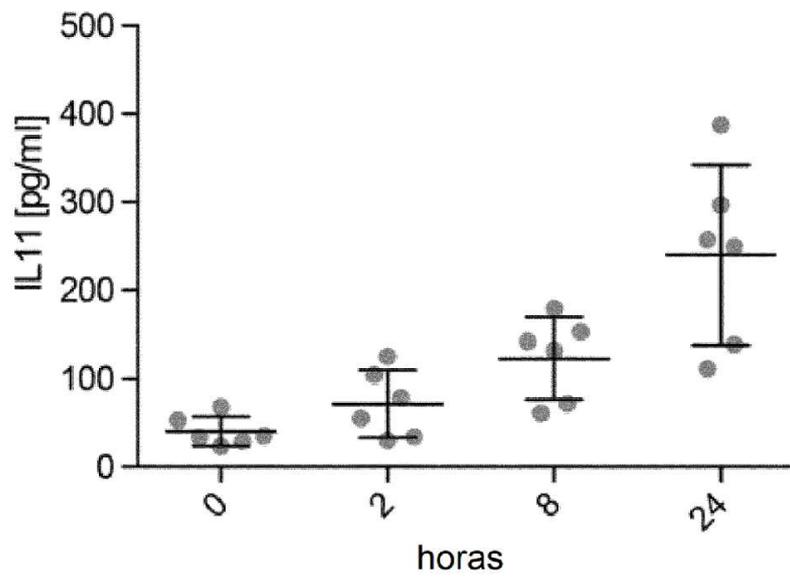


Figura 19C

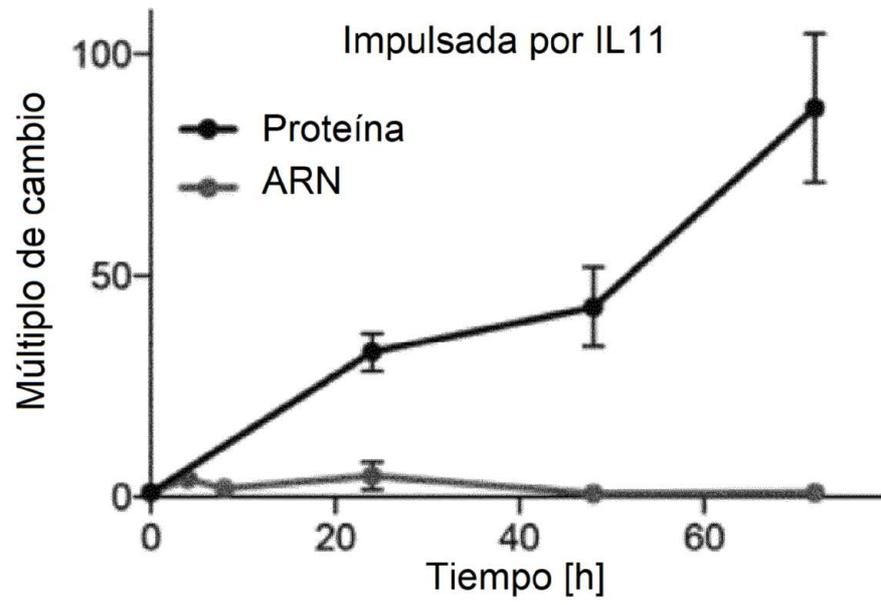


Figura 19D

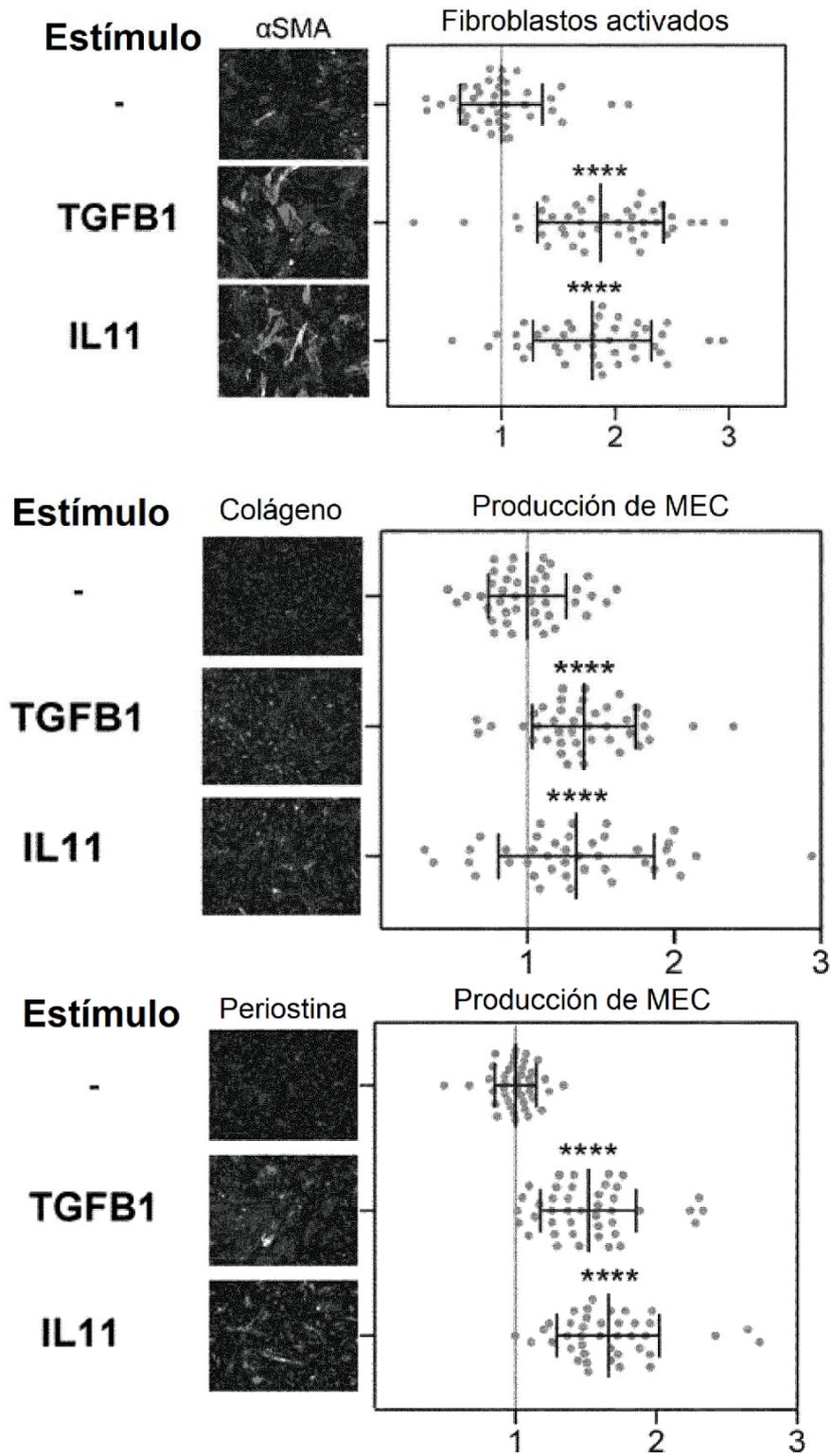


Figura 20A

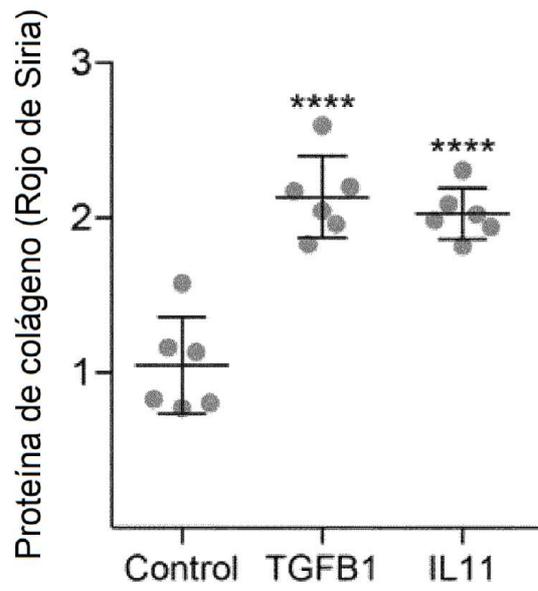


Figura 20B

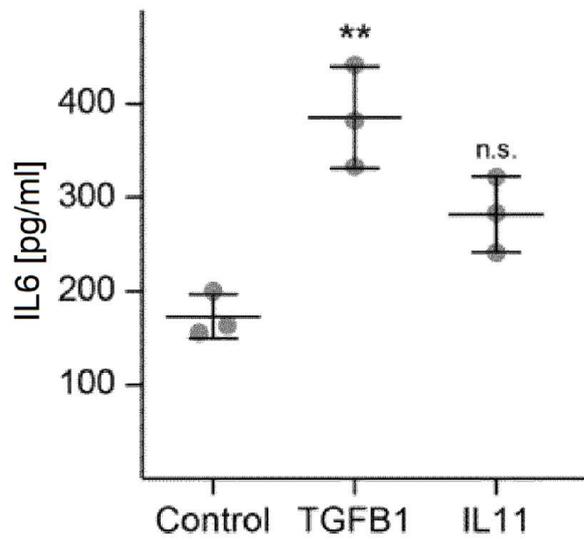


Figura 20C

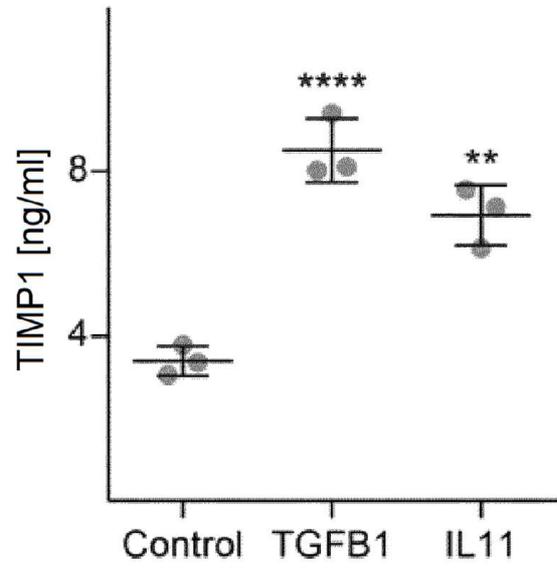


Figura 20D

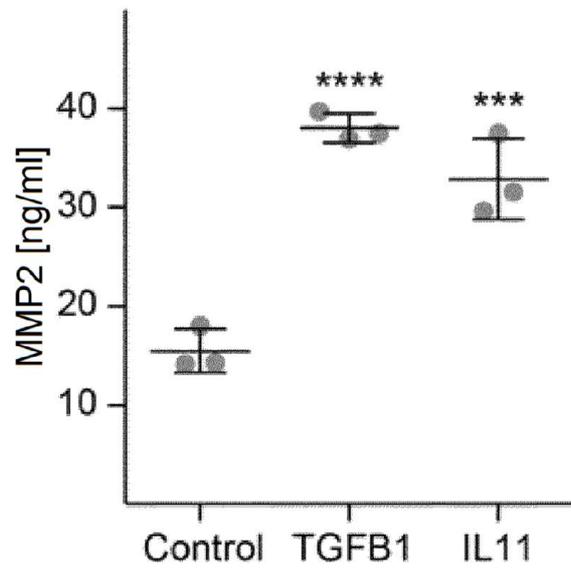


Figura 20E

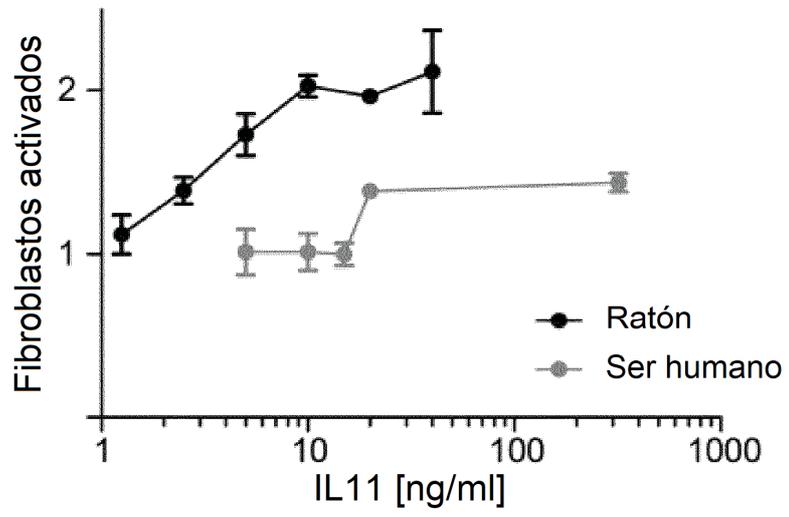


Figura 20F

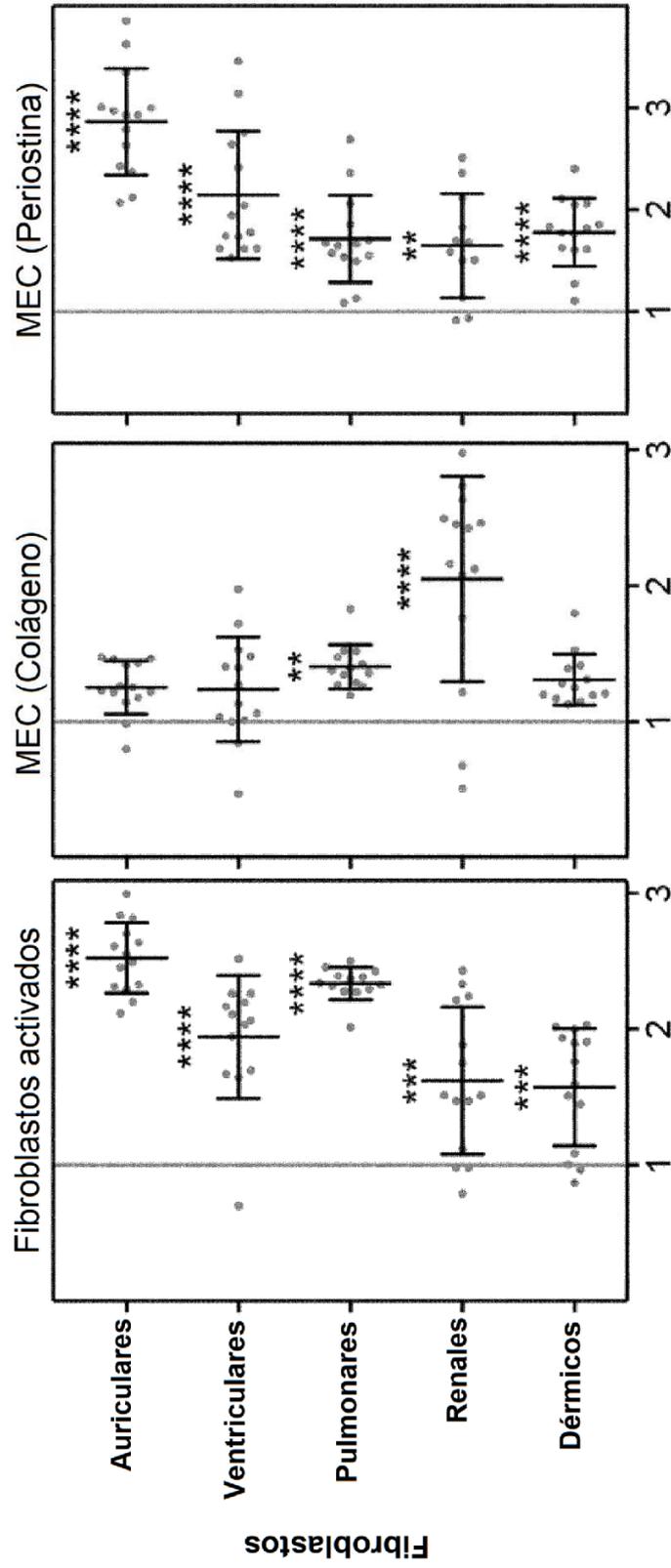


Figura 21A

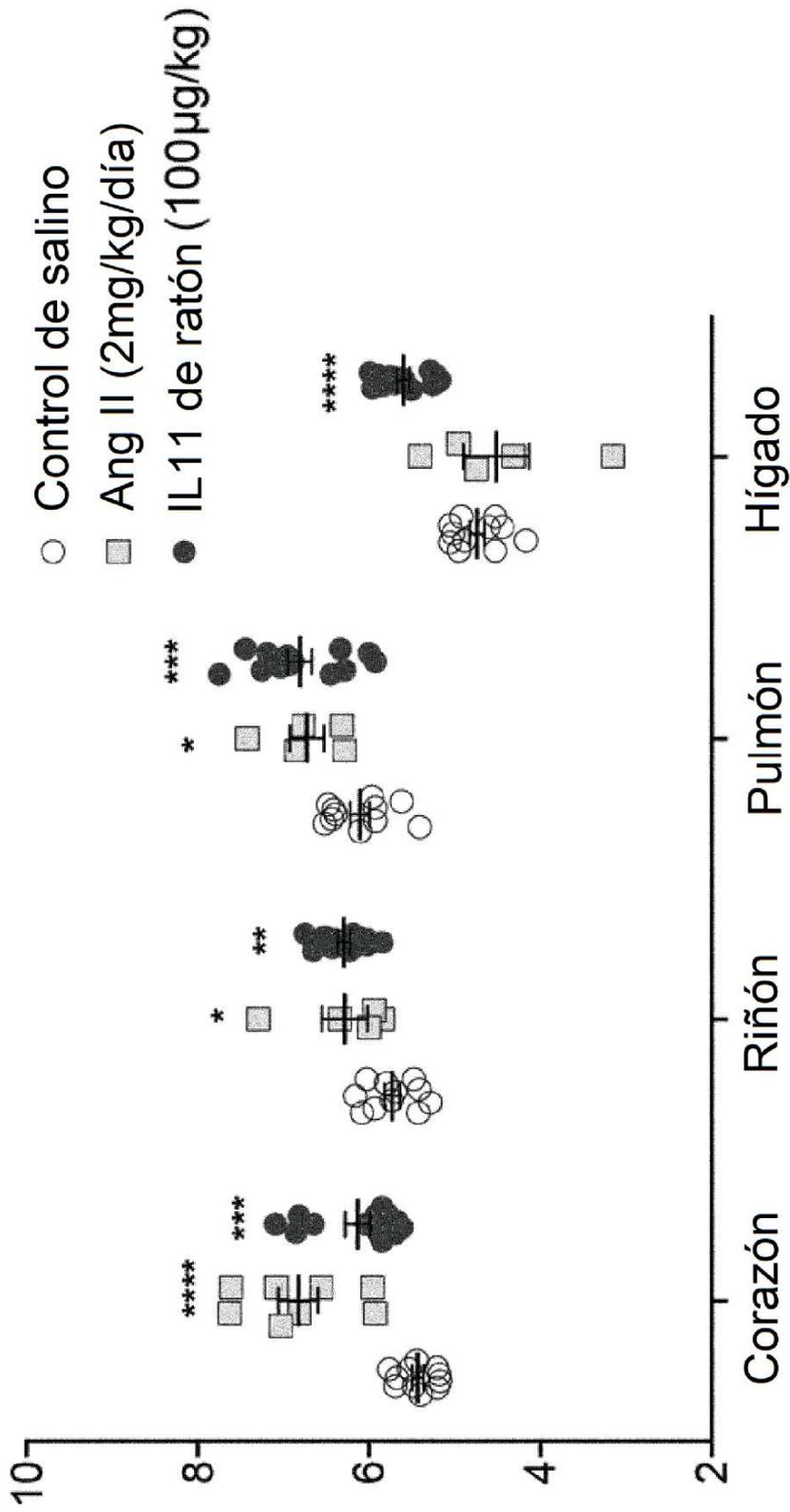


Figura 21B

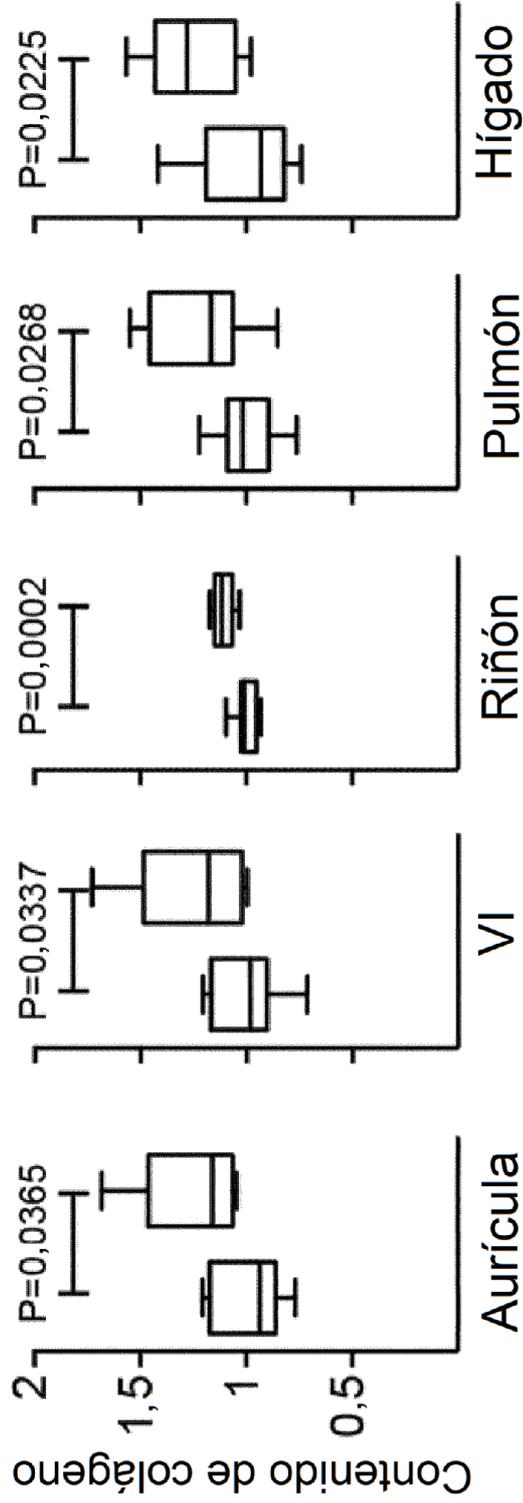


Figura 21C

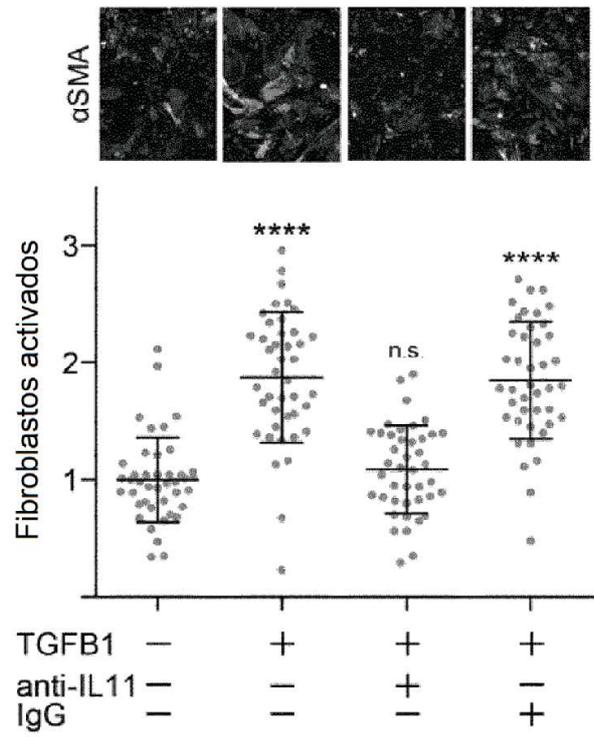


Figura 22A

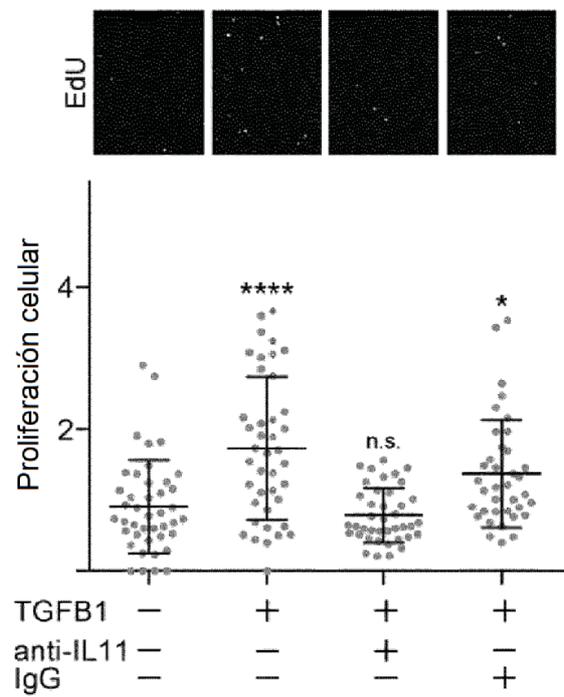


Figura 22B

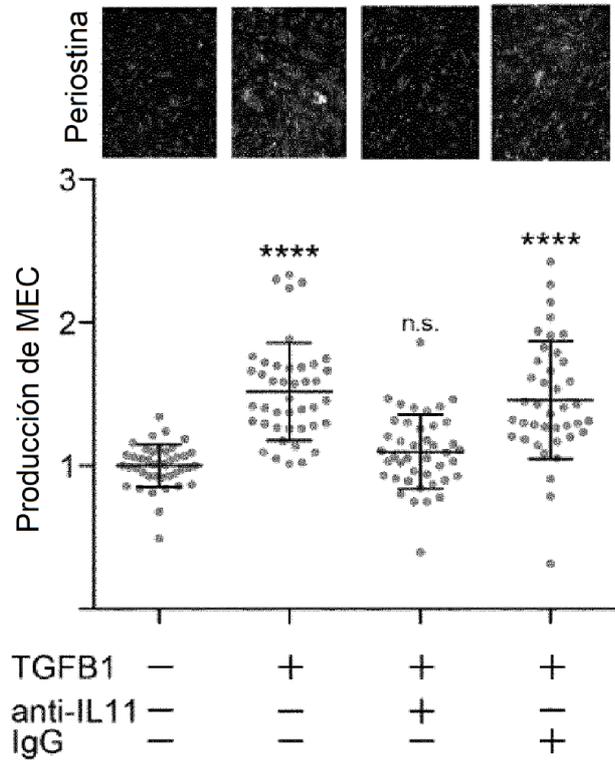


Figura 22C

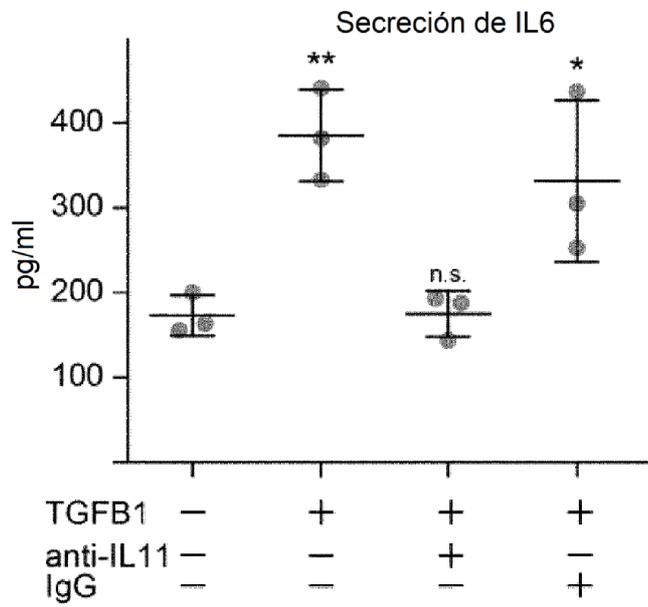


Figura 22D

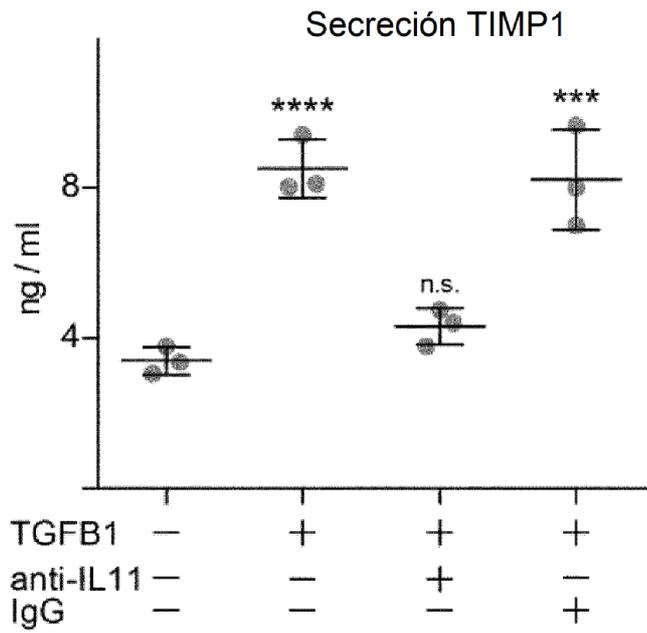


Figura 22E

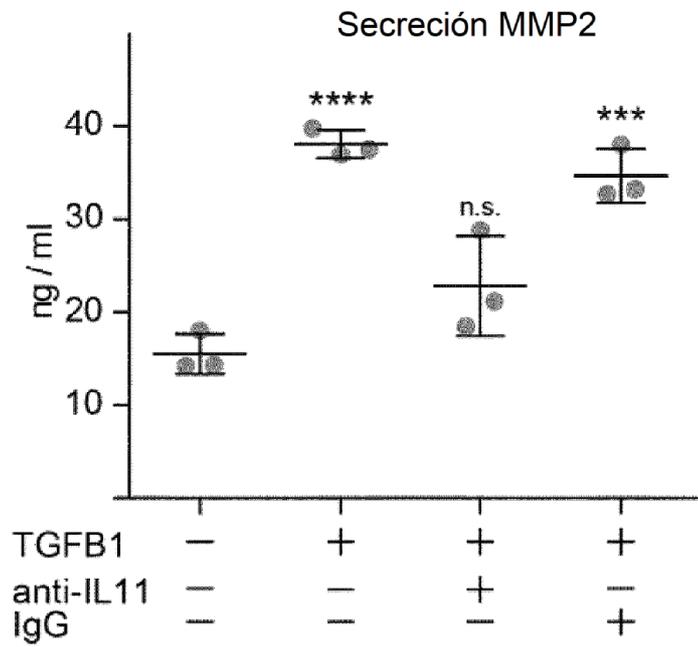


Figura 22F

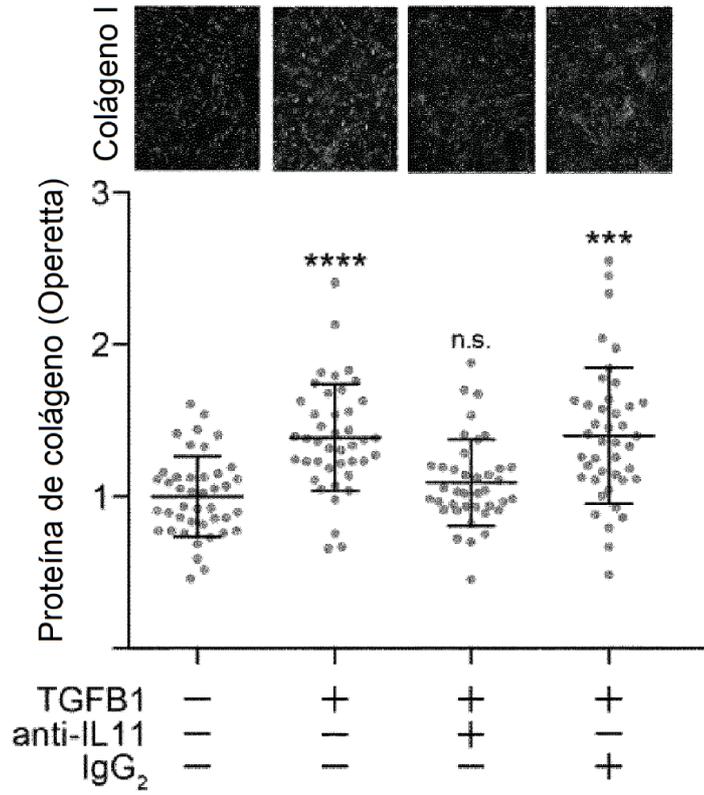


Figura 23A

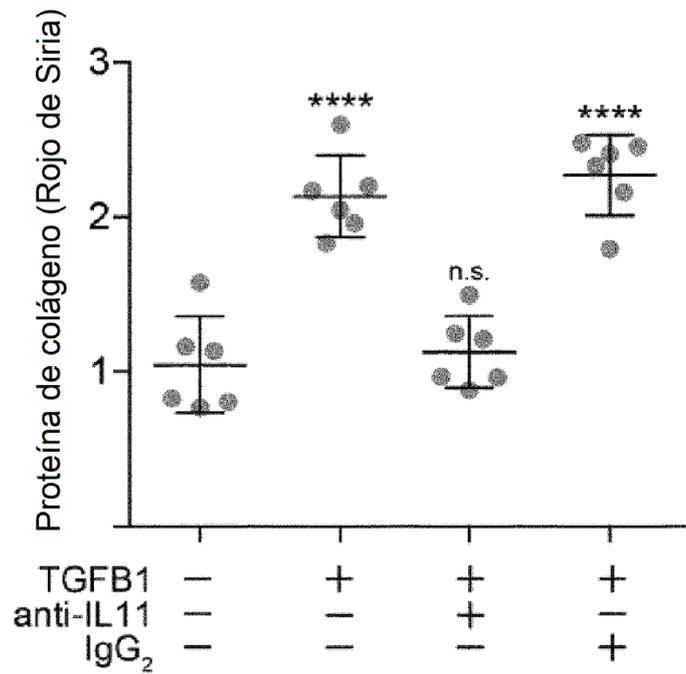


Figura 23B

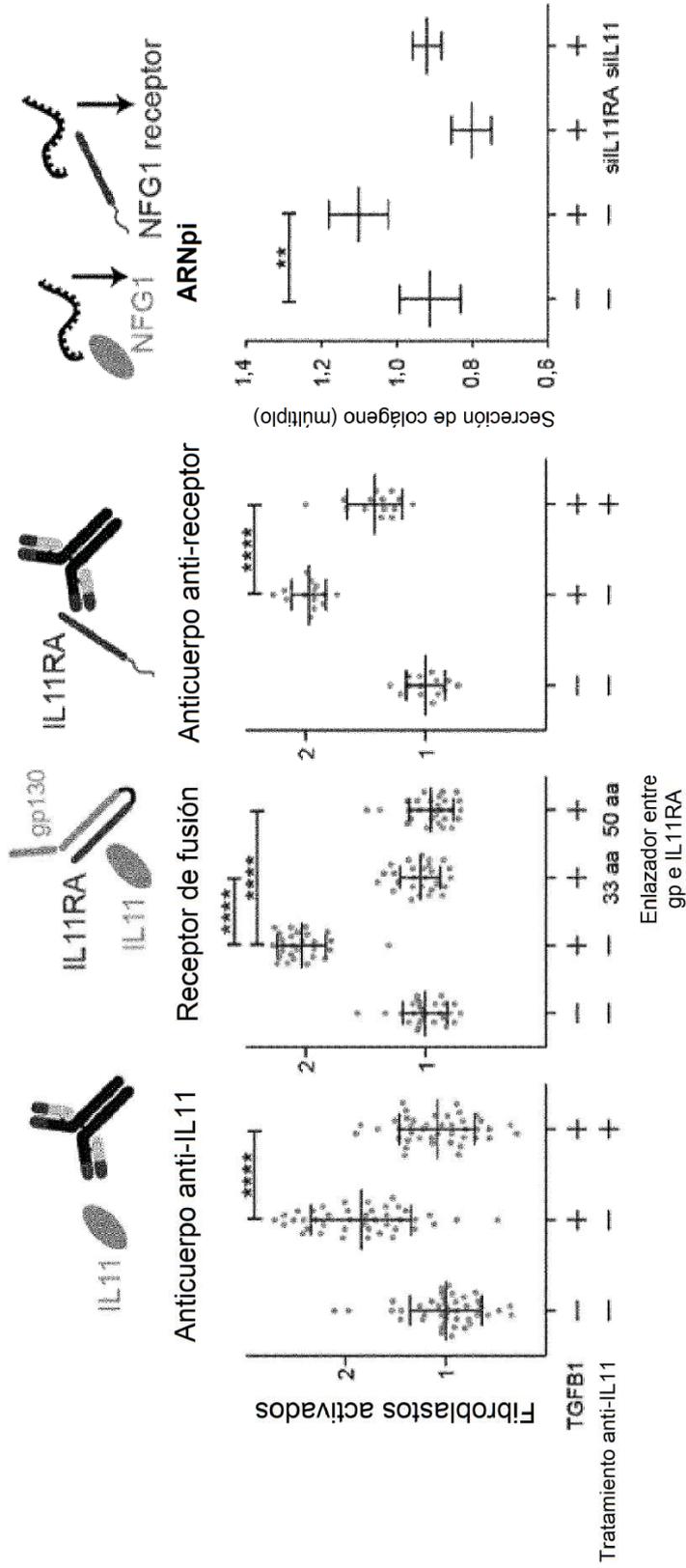


Figura 24

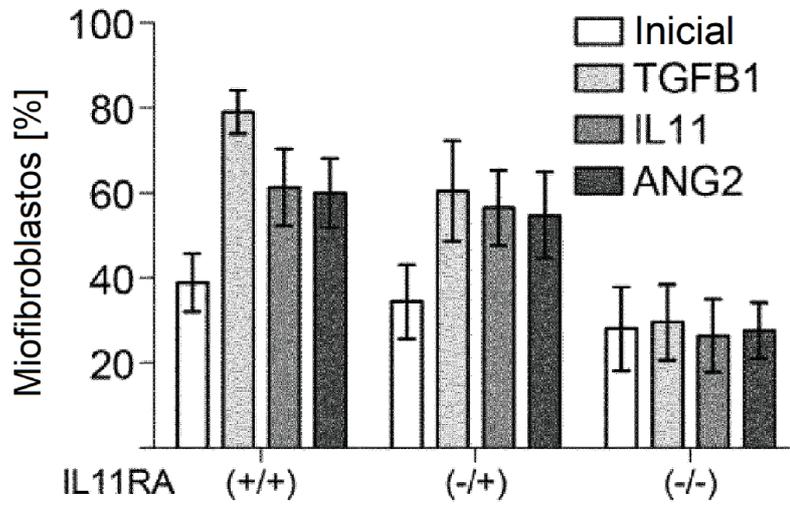


Figura 25A

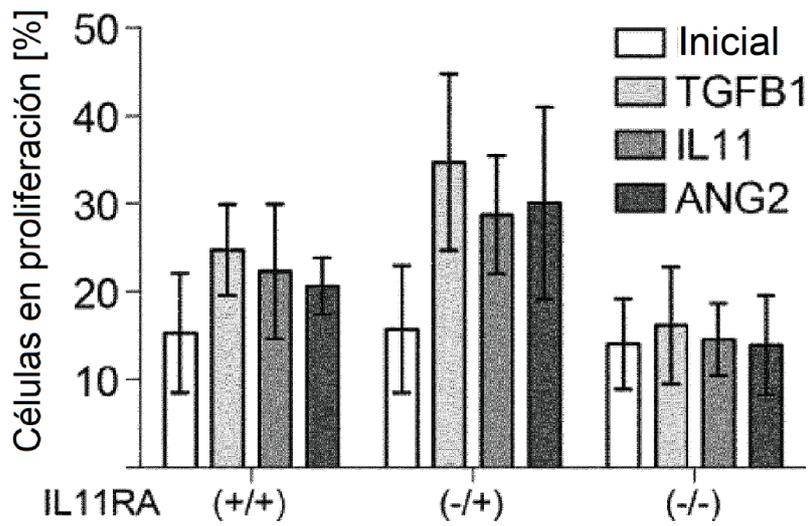


Figura 25B

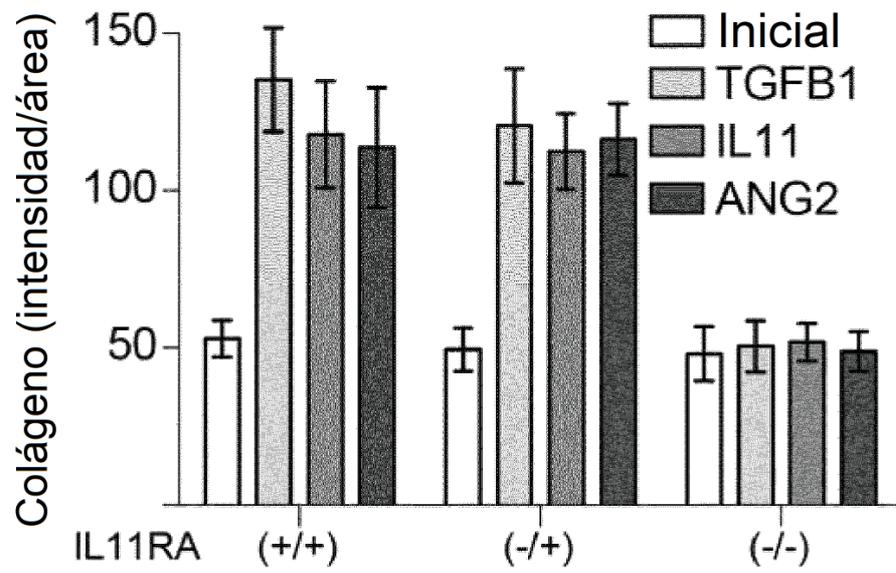


Figura 25C

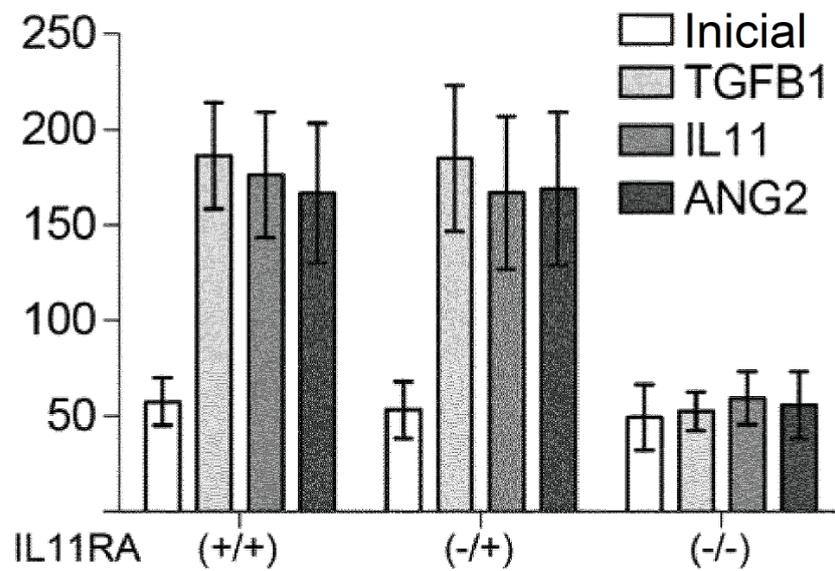


Figura 25D

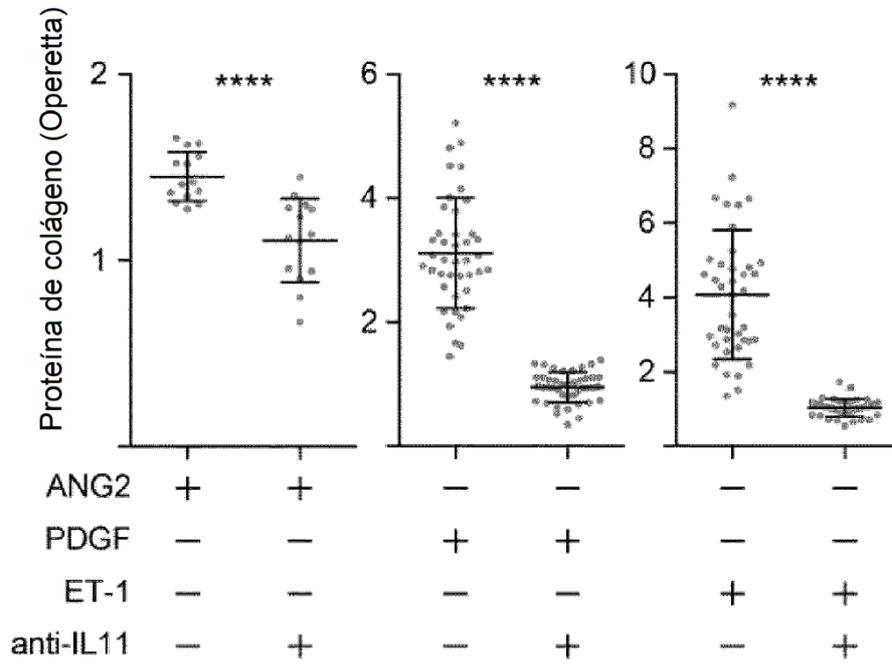


Figura 26A

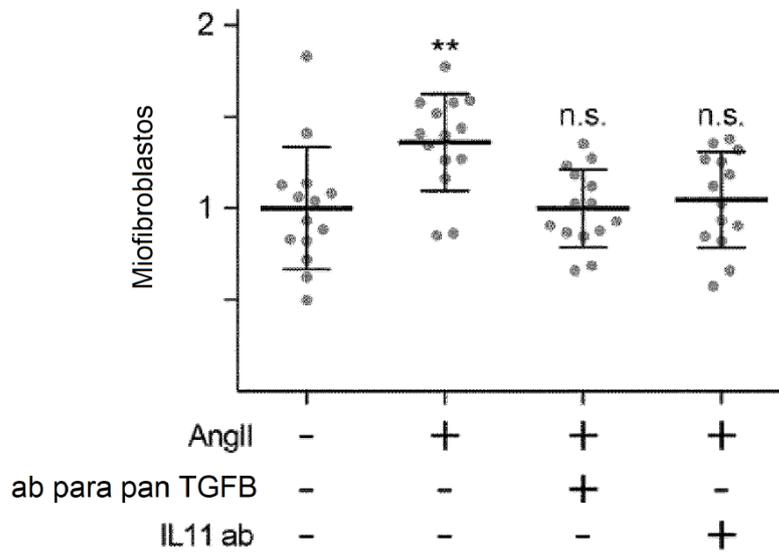


Figura 26B

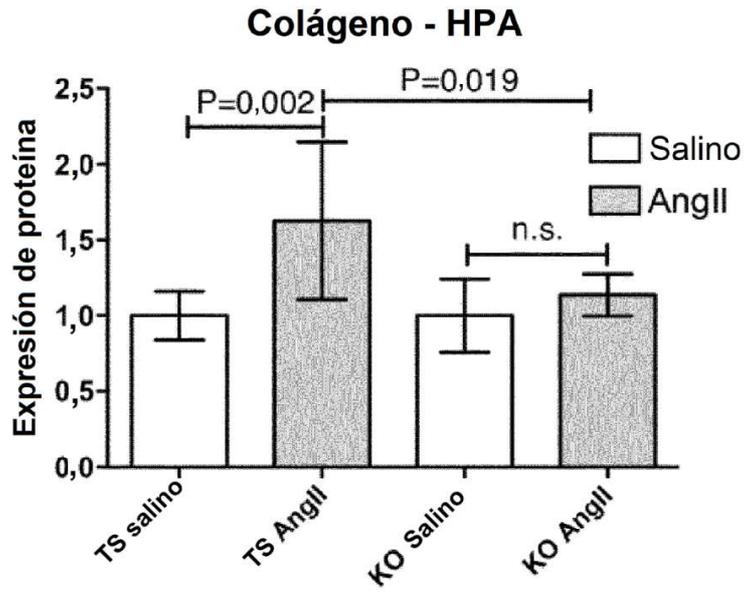


Figura 27A

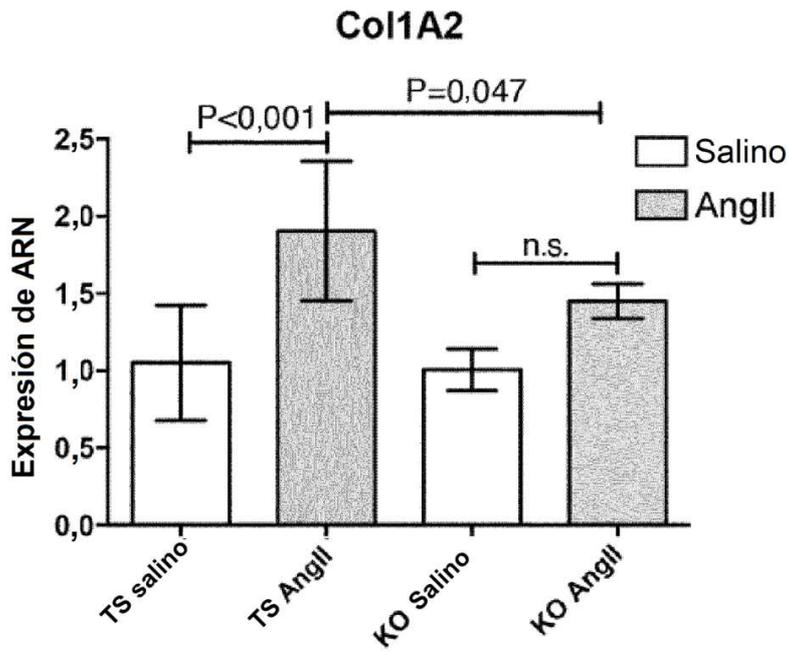


Figura 27B

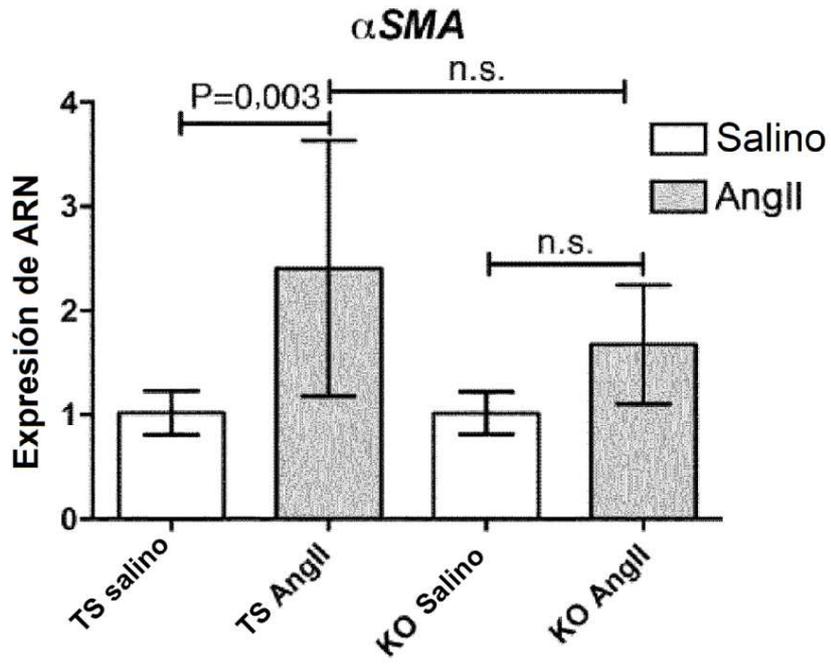


Figura 27C

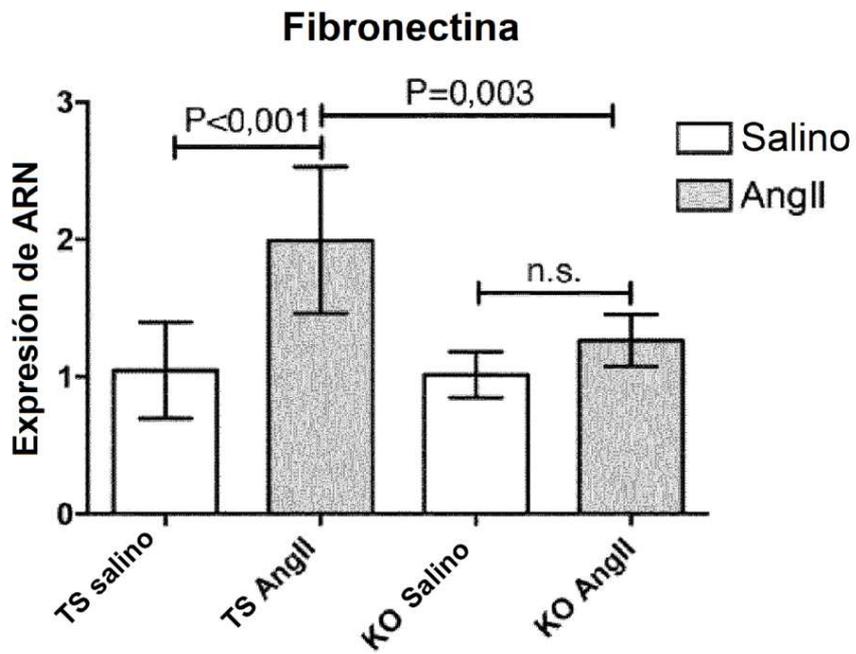


Figura 27D

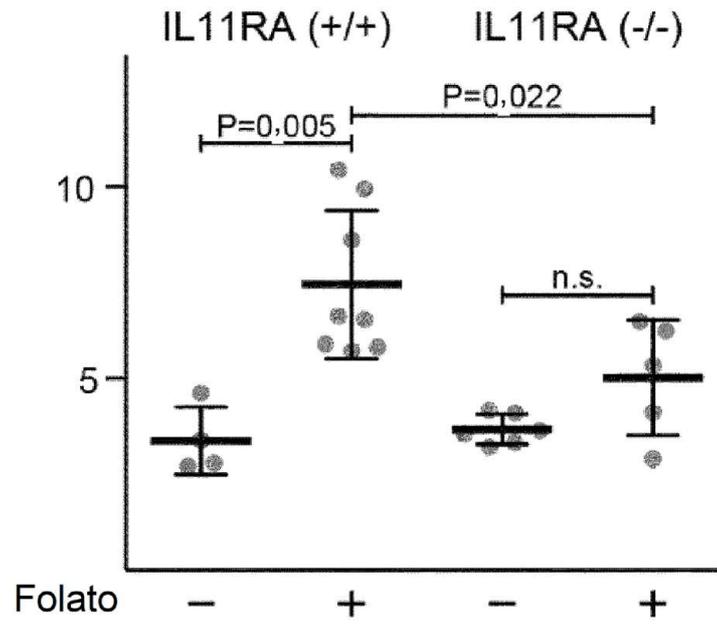


Figura 28

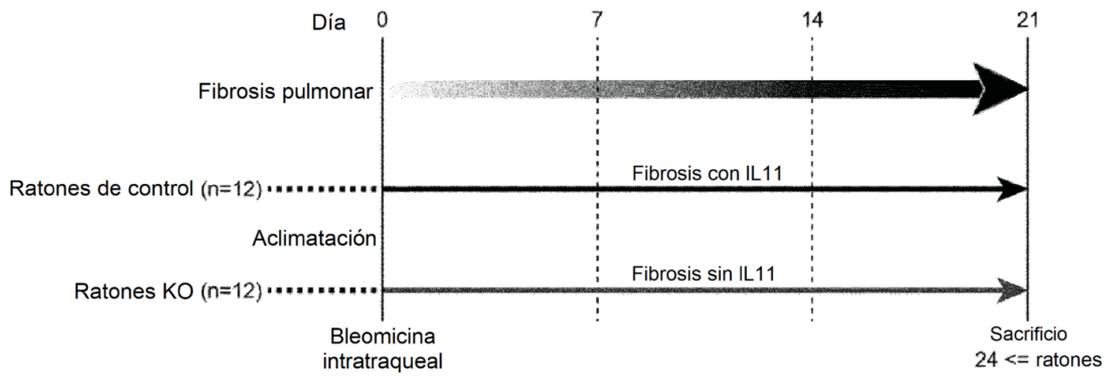


Figura 29A

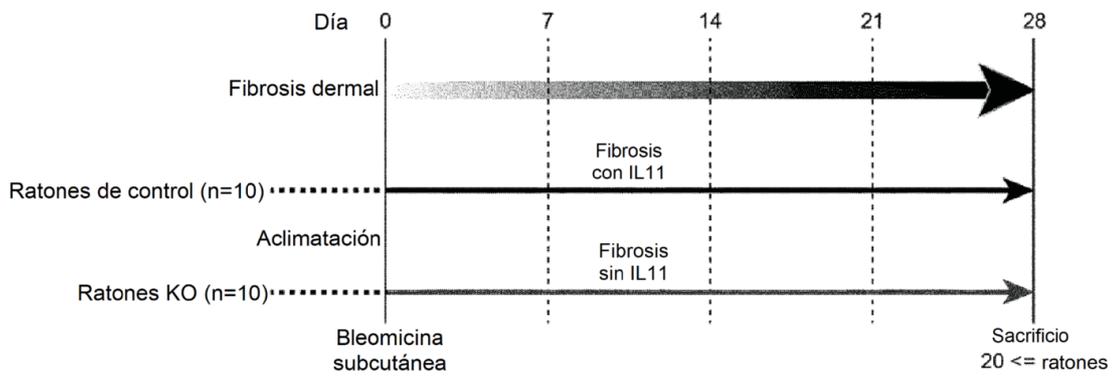


Figura 29B

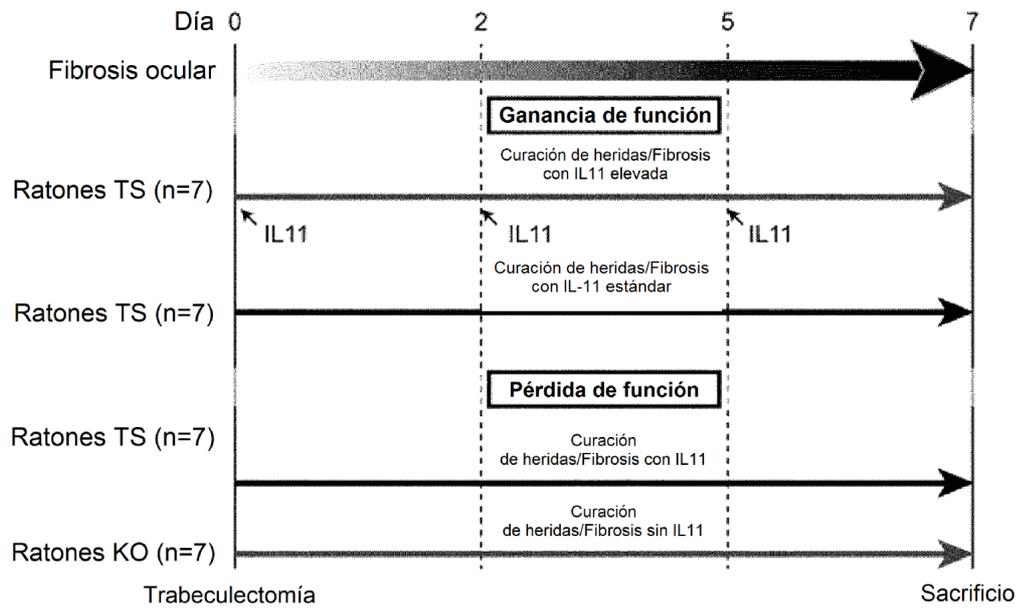


Figura 29C

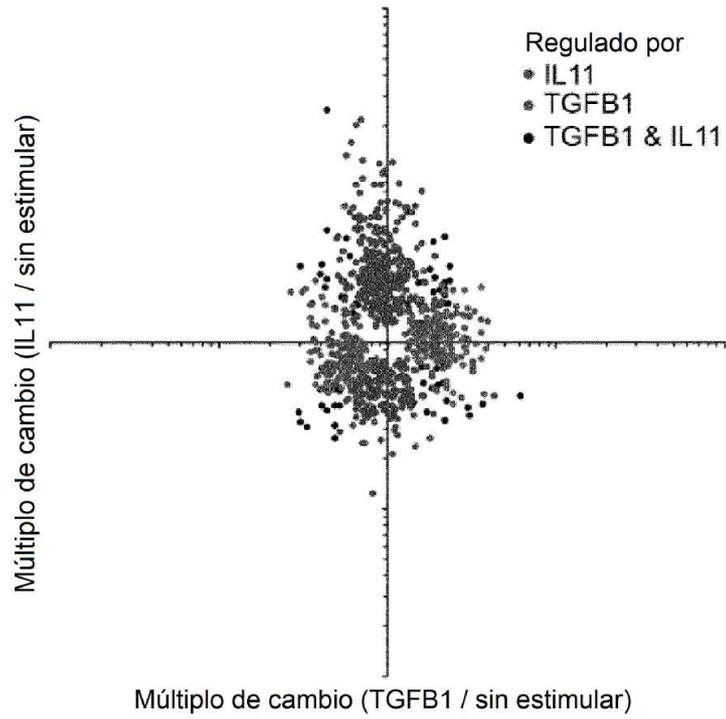


Figura 30A

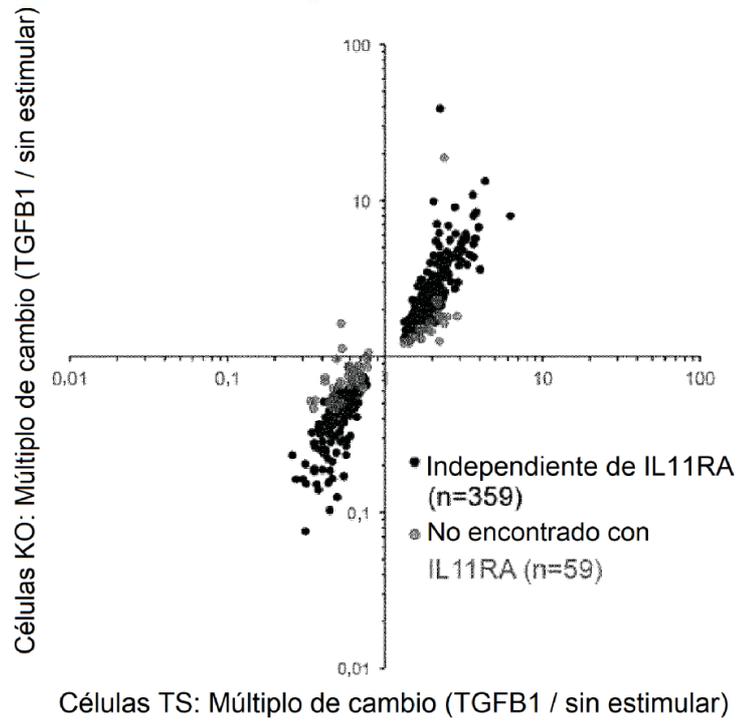


Figura 30B

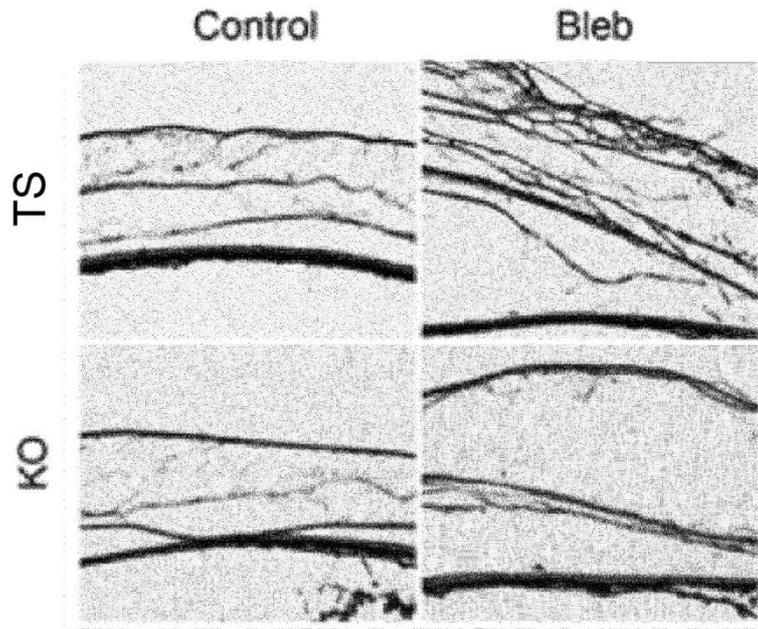


Figure 31A

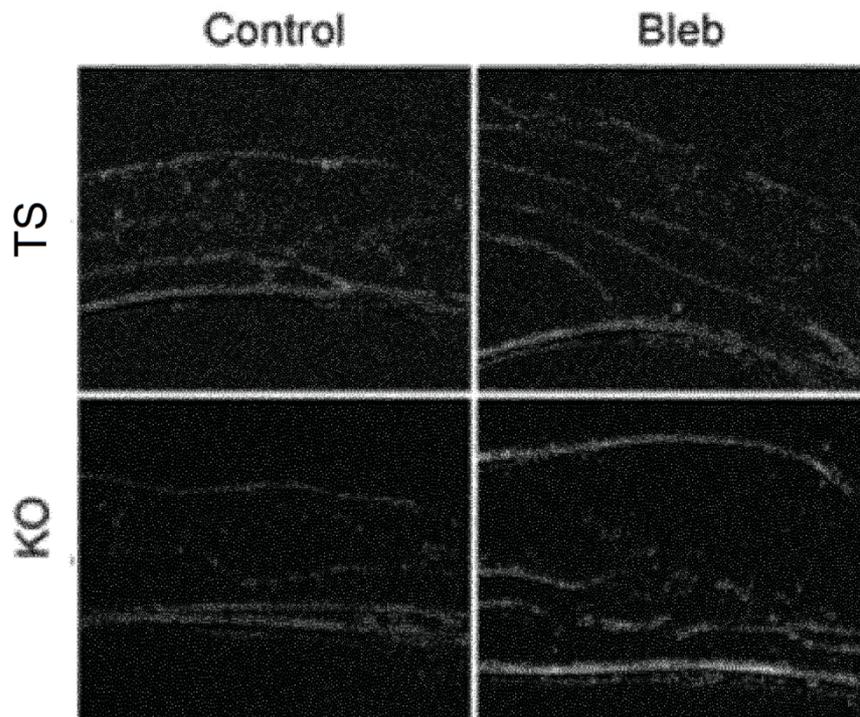


Figure 31B

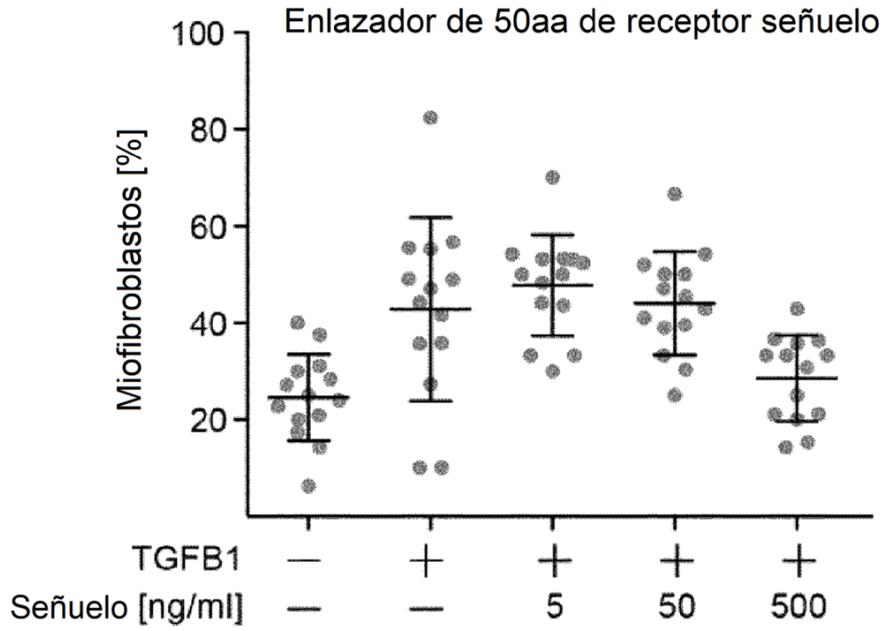


Figura 32A

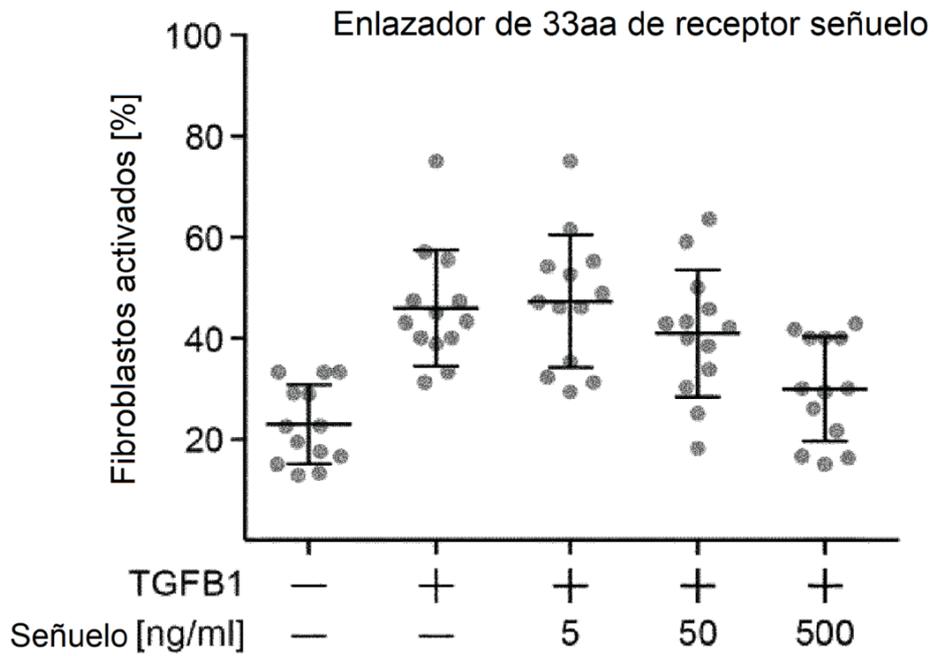


Figura 32B

ID de SNP	Posición (hg19)	Valor P	FDR	Genotipo	Alelo menor	Secuencia	SEQ ID NO
rs10831850	11-12566917	1,76E-07	0,0248	G/A	A	GTAAGGGATGTAATCGGGTACTGA[A/G]GAAAAGAG CCTGGATGCAGAGCCAGC	19
rs4756936	11-12599138	1,76E-07	0,0248	C/T	T	TTGATAACTTCAGCATCTGGATCAC[C/T]GTGGGATT AGCATCTGTTGTATTT	20
rs6485827	11-12578182	1,76E-07	0,0248	C/T	C	GTGTGATTGCTTAAAAAAAACACT[C/T]ACATTGTTT TGAATCACACCTCACA	21
rs7120273	11-12581045	1,44E-07	0,0248	T/C	T	GCTCAGCTAATCAATGACCAGTCT[C/T]TTAATTCTT CTAATGCCCTATATGGT	22
rs895468	2-223621273	2,70E-07	0,0306	G/A	G	GCAGTGCTCAGAAGAGCAGCAGCCCA[A/G]TGACATT TTGGGGCTATAAGAGGTA	23

Figura 33

ID de SNP	Posición (hg19)	Valor P	FDR	Genotipo	Alelo menor	Secuencia	SEQ ID NO
rs1000574	19-55114775	0,0432	0,6581	C/T	T	TGTCAGTAAATACTTAACATTTTTC[C/T]GTGCA ATGTATGTCATAAATATGGG	24
rs10403345	19-56741808	0,0355	0,6372	G/A	G	GGgtgaagtttggaaacaggatatac[A/G]tgtgatgcaatcgta gaaccaag	25
rs10419994	19-55726220	0,0334	0,6372	C/T	T	aaaccataGTATCATCCTCCCAA[C/T]AGTCAAC CCAGggaatcacagat	26
rs10426177	19-56269096	0,0103	0,6372	C/T	T	TAAGACGGTATTCTCTAATTCTGAA[C/T]GGAAG AACTCCTCTCCCAAGACATG	27
rs11084337	19-54916104	0,0370	0,6372	C/T	C	aggTgaaacaacaaggggg[C/T]gagggcgtaattta aacattttct	28
rs11671244	19-56502995	0,0242	0,6372	C/A	A	TATTAGATTTTGTGGGATTTTCAT[A/C]GTTAC ATTTGTTACCAGCCCAATTT	29
rs11882068	19-56227165	0,0005	0,2204	A/G	G	GATCCAGTCCAAAGTCACATCATC[A/G]CCAG CTGGAAGACCCTAGGGCAAAAG	30
rs12104147	19-54935505	0,0150	0,6372	G/A	A	ACCATGACGGTGTCTCATTGCTTT[A/G]ACCAT TAGTAA ^t cattcattcattc	31
rs12608558	19-55715090	0,0275	0,6372	A/G	G	ACCTGTCACATTTTGTCAAGCTCCCA[A/G]CCAC CCCCTACCACACTGTCTTATAA	32

rs12610132	19-55032293	0,0408	0,6372	A/G	G	GACACGATGTCTTCAGTCTCCAGCT[A/G]AGCT TGGACTGTGAGGATGGGTCAAG	33
rs12610617	19-56443519	0,0030	0,3650	C/T	T	CTCTCAAGTTTGGCCAGGGGATACG[C/T]GGGA AGTGCCCTGGGGGGCCGACC	34
rs160104	19-56433203	0,0012	0,2352	G/T	T	ctggctctccagctctgggct[G/T]ccagtattctgggttggc 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	AAGTAAGGTGTC AAGGAGGCCATGC[C/T]CACT CTGTAGGTTCTAGGAAAAGAAT	38
rs2043690	19-56383651	0,0305	0,6372	T/C	T	ATGCCTGAAAGAAAACAAGAGCAAAT[C/T]GTCT CAGGAGGTAGGTAATAGGATG	39
rs2194	19-56257259	0,0064	0,5195	G/A	A	AGCATATTTCATTGATTTCCCTTACATA[A/G]CAAAT GCTCCTTTTTAAGTGCTCAA	40
rs2288419	19-55693244	0,0140	0,6372	A/G	G	TCAGTACGTATTCCCTGCATCAGTGC[A/G]TCCT GCGGTTCCCTCCAACACAGTCAGC	41
rs2288521	19-55708557	0,0262	0,6372	T/C	T	AGTGGAGGCCCTGGAACCCGGGACG[C/T]TGT ACAATTTACCCGTGTGGGCAGA	42
rs2288527	19-55699077	0,0454	0,6738	A/G	G	TGCCATATAATCTCAGGGTGCAACG[A/G]ATAA ACAAGGGGTGATGCCCGAAGAA	43

rs2637107	19-56566741	0,0317	0,6372	G/A	A	CTCTGTCCCCTCAACTTCTTTCTAC[A/G]TGGTC ATGTCCCCTTCTTTAGTTCCT	44
rs299164	19-56319796	0,0273	0,6372	A/C	C	GCAACAAAAATCTTATACATCACCA[A/C]ATGTC TGCTTAGCGGCAGAAATTGCC	45
rs299169	19-56316796	0,0324	0,6372	G/A	G	GCTAGGTAAAGGACTCTGAAAAATAC[A/G]GCAA CATGAAAAACATCCAGTCTCC	46
rs303997	19-56424443	0,0007	0,2204	T/C	T	TCCATTTGCCCAGTGCAGCATAGCC[C/T]GCAT TGCCAAAGGTGGTCTTCCCAAC	47
rs304001	19-56423668	0,0015	0,2352	C/T	C	CGTTTAAACAAAAGAACACACTGAGAT[C/T]GAGG GCCTGGAAGTGCCTTTTCATTG	48
rs304002	19-56423254	0,0141	0,6372	C/T	C	TTCTACGACTTTTTTCTACTGCCTACA[C/T]GAGTC CCAGGAGGAAGACTTCACAA	49
rs306463	19-56497077	0,0068	0,5195	T/G	T	gccaaatgtttgaaaaatccatt[G/T]gaagaatttatgggaatgc atttt	50
rs310445	19-56173551	0,0396	0,6372	G/A	G	GAAGATTGTTCAAGAAAAAGGCAGAG[A/G]GCAT GATGACAAACACAAAAATGAAGA	51
rs3745429	19-54937593	0,0233	0,6372	A/G	G	CCTGGGACTATCCCCCTGGCCCGGGCC[A/G]CAC ACATGTGCCCTGTGACCAGGGA	52
rs3786867	19-55684200	0,0394	0,6372	C/T	T	GCTGGCTGTGAGGAGTCCCGAGAA[C/T]TCC CTTGCTTGTCATGAATTTATC	53
rs4629084	19-56420157	0,0243	0,6372	G/T	G	AAGGTGAAGAGTGGAAAAAGGCAGA[G/T]GATC AGGAAAAATAACTAATGGGTA	54

rs464765	19-56430224	0,0208	0,6372	A/C	A	ggcttaaaaaaggaattagagagc[A/C]ctccctctctccaacat cttttc	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	GTGCGTATATGTTACAAAGTGGCT[C/T]GTGTT GACCCGCTGCCTGTGGAAG	57
rs516022	19-56609371	0,0408	0,6372	C/A	C	GCCTGGGTGCTGACCGGGGTGCC[A/C]TTG CTGGGCTTAGCAGGGCCGGCTT	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	gtcccagtlactcacacaggaaggal[C/T]gcaggagttgaaacc agcctgtgc	61
rs6509939	19-55851708	0,0337	0,6372	T/C	C	CACCCCTCAGGGCCTCCTCCCTGACCC[C/T]TCTC TCACCCCCGGGACCTCCCTGC	62
rs8110255	19-56568978	0,0045	0,4527	T/C	C	GCAGGCTGTGTTCCTTGTATTGTT[C/T]CCCTTG CTACAGGCACCTCAGCCTT	63
rs8112791	19-56723492	0,0236	0,6372	C/A	C	gtcagtttgaaacaggtaaaatca[A/C]aatgctcatgtctctaca gggaaa	64
rs873732	19-56745520	0,0194	0,6372	G/A	A	AGCCAAATTCGTCAGTGAATGAGGCA[A/G]AGAA ATTGGTAAAAAAGGAAAGT	65

Figura 34

ID de SNP	Posición (hg19)	Valor P	FDR	Genotipo	Alelo menor	Secuencia	SEQ ID NO
rs2823699	21-17628689	1,62E-08	0,0033	T/C	T	TACATAGTAGGCTTAAGAGCAAATG[C/T]CTACC TTTTCCCTCTGTTTTCAACTC	66
rs4973978	3-41667545	1,69E-08	0,0033	T/G	G	GTTGGTTGGTTTGTTCGCCCTTTAA[G/T]GGTGC CATTTAATGACAGATTTCAT	67
rs11744285	5-124622296	1,75E-08	0,0033	A/G	G	GCCCCGGTGACAAGAAATGGCAAAAC[A/G]TTTA TTCGGCATTAAACAATGTGTA	68
rs7120273	11-12581045	3,32E-08	0,0041	T/C	T	GCTCAGCTAATCAATGACCAGTCTC[C/T]TTAAT TCCTTAATGCCTATATGGT	69
rs10831850	11-125666917	5,12E-08	0,0041	G/A	A	GTAAGGGATGTAATCGGGTACTGA[A/G]GAAA GAGCCTGGATGCAGAGCCAGC	70
rs4756936	11-12599138	5,12E-08	0,0041	C/T	T	TTGATAACTTCAGCATCTGGATCAC[C/T]GTGG GATTAGCATCTGTTGTATT	71
rs6485827	11-12578182	5,12E-08	0,0041	C/T	C	GTGTGATTGCTTAAAAAAAACACT[C/T]ACATT GTTTTGAATCACACCTCACA	72

rs7079768	10- 131271870	9,92E- 08	0,0070	G/A	A	ACTTGTGCCAGGCTGGCTTTGCAAC[A/G]ATGA GCCTGAGAAAGCTGTAGAAGT	73
rs1293764	12- 113425679	1,27E- 07	0,0080	A/G	A	GAGACACAAGAGGTGGCCAGGTCTT[A/G]GGG ATTTAGGAGTTGGGTTCAAGGC	74
rs1862945	7-50936184	6,84E- 07	0,0387	G/A	A	TGAGTCTGTGAGGAGAAAATGAACAA[A/G]TCTA CCACAGTCATCCAGAAATGAGA	75
rs10496038	2-55340963	9,41E- 07	0,0484	C/T	T	ATCAGAAGGCTAAGGAACCCACCTGT[C/T]TAATA GTCTGGTGCCAAACACAGGC	76
rs12669489	7-50961697	1,05E- 06	0,0493	G/A	A	catcaataagaaaaacaaaaataat[A/G]taatagaaaaatgcat aagagactt	77

Figura 35

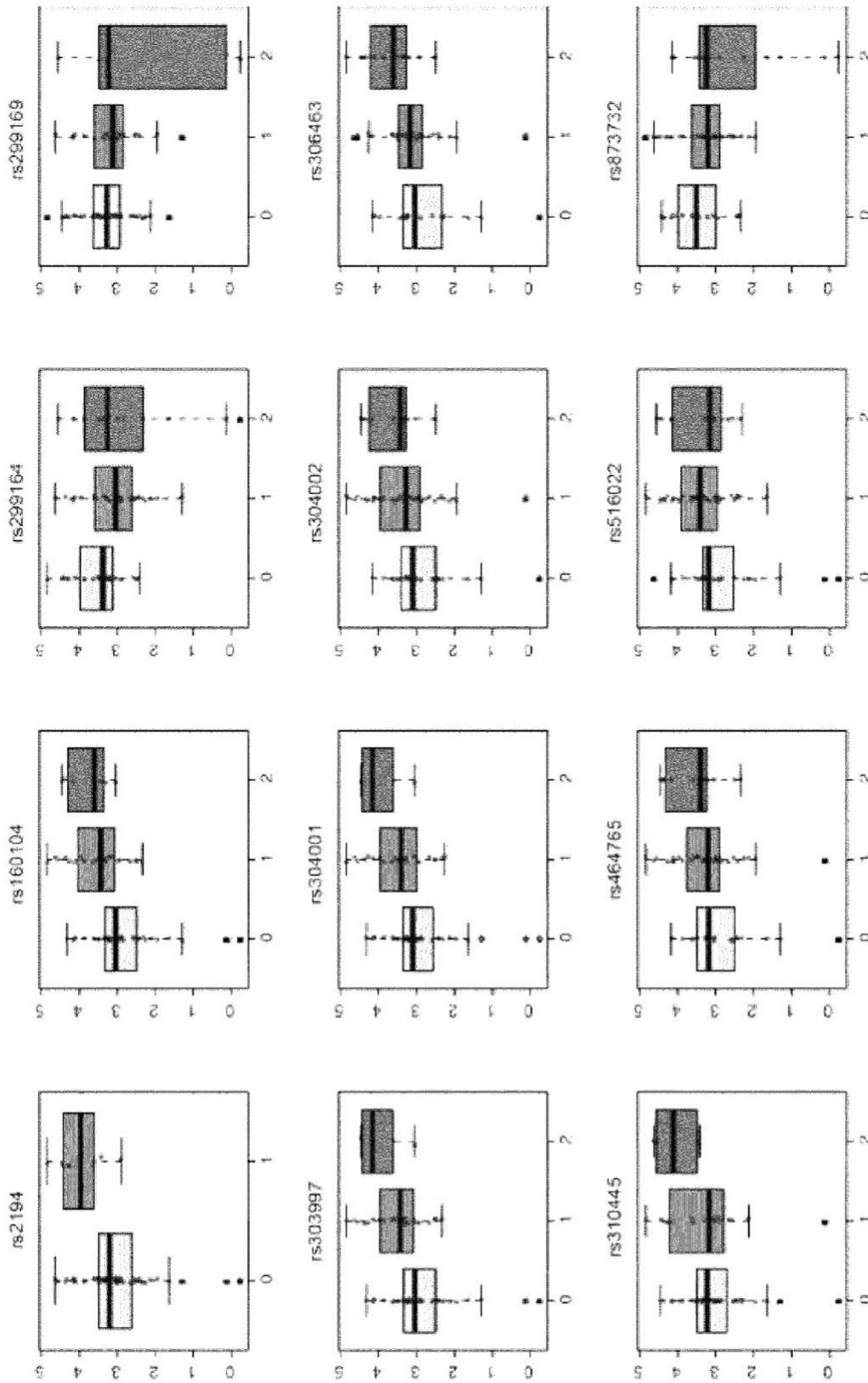


Figura 36A

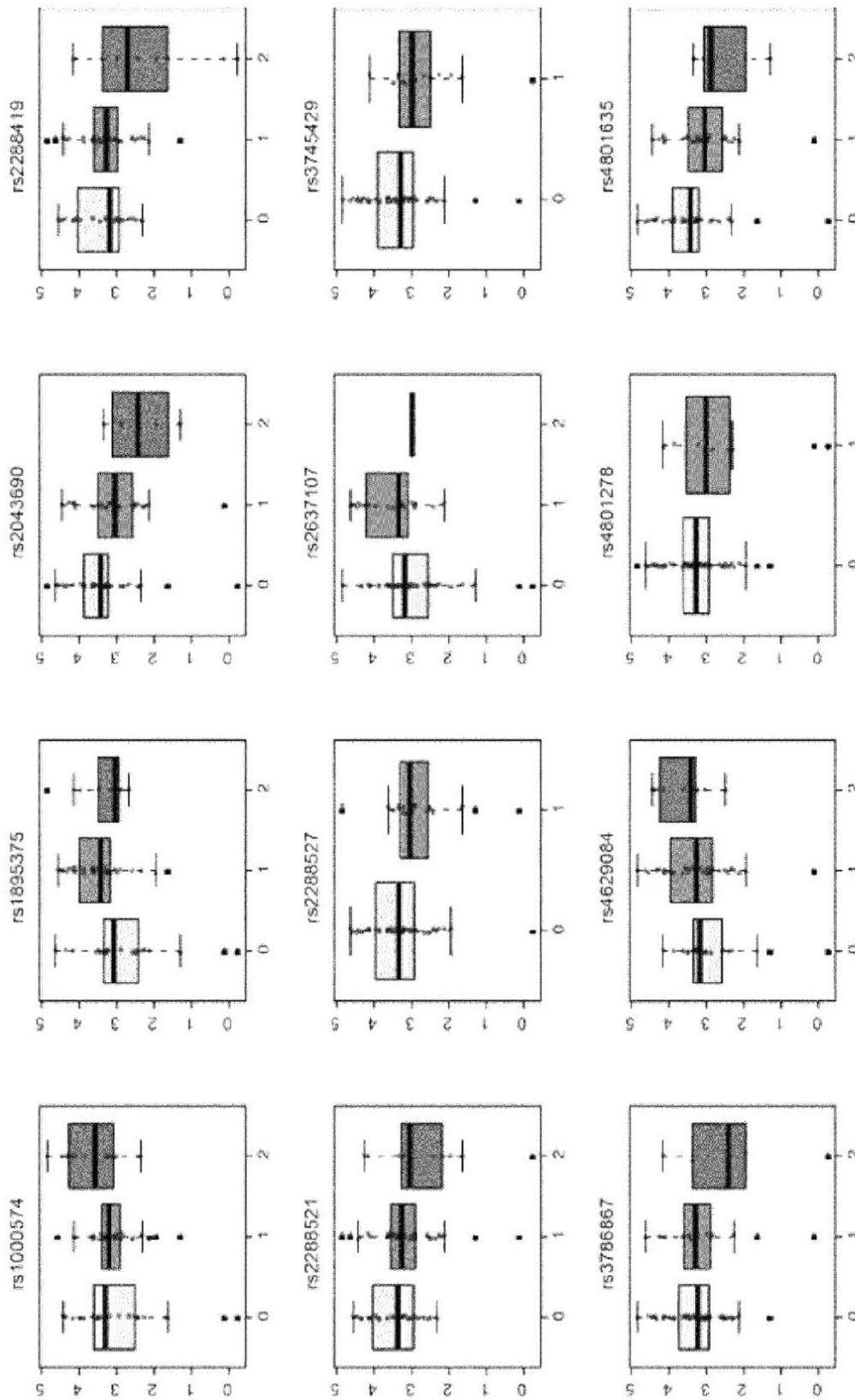


Figura 36B

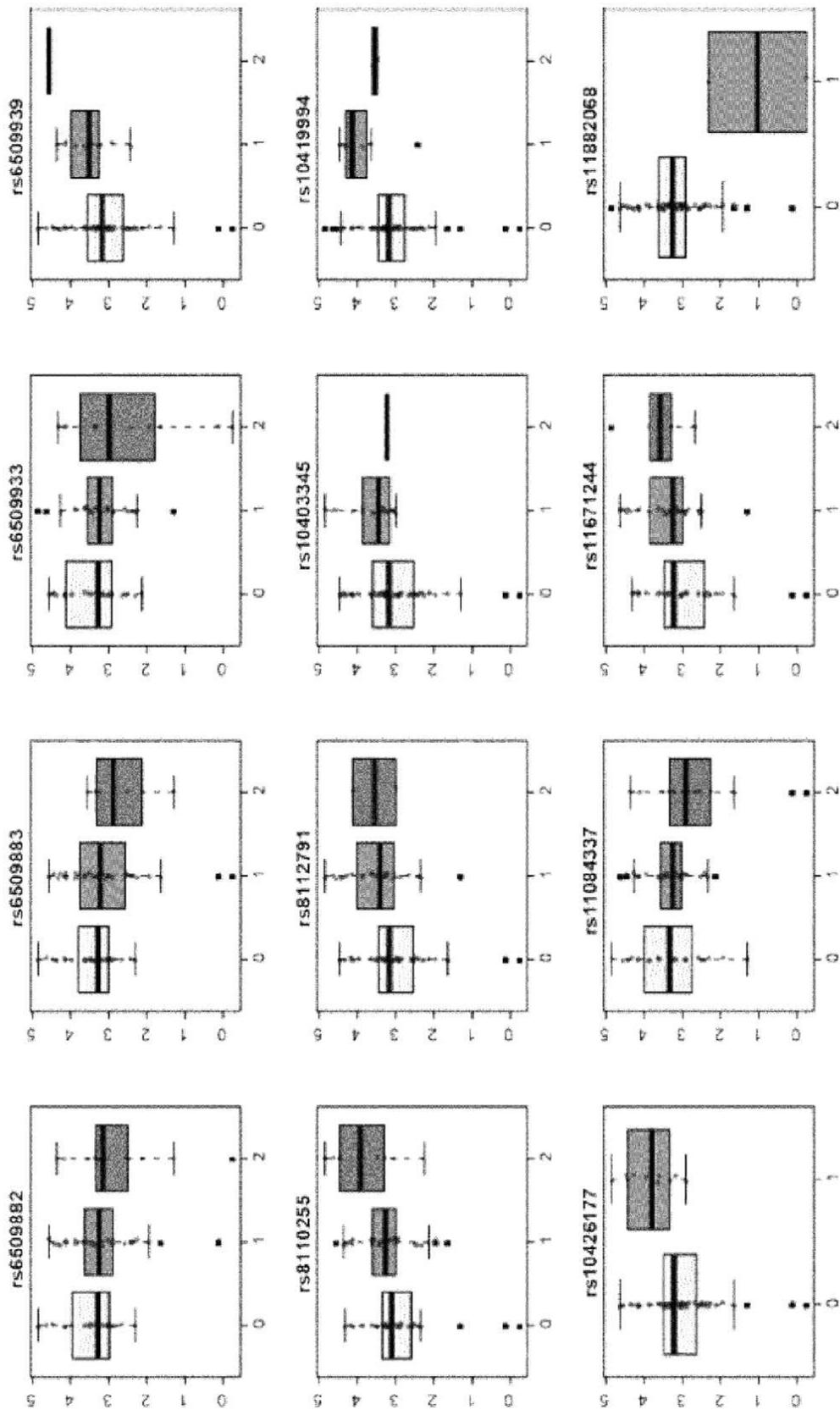


Figura 36C

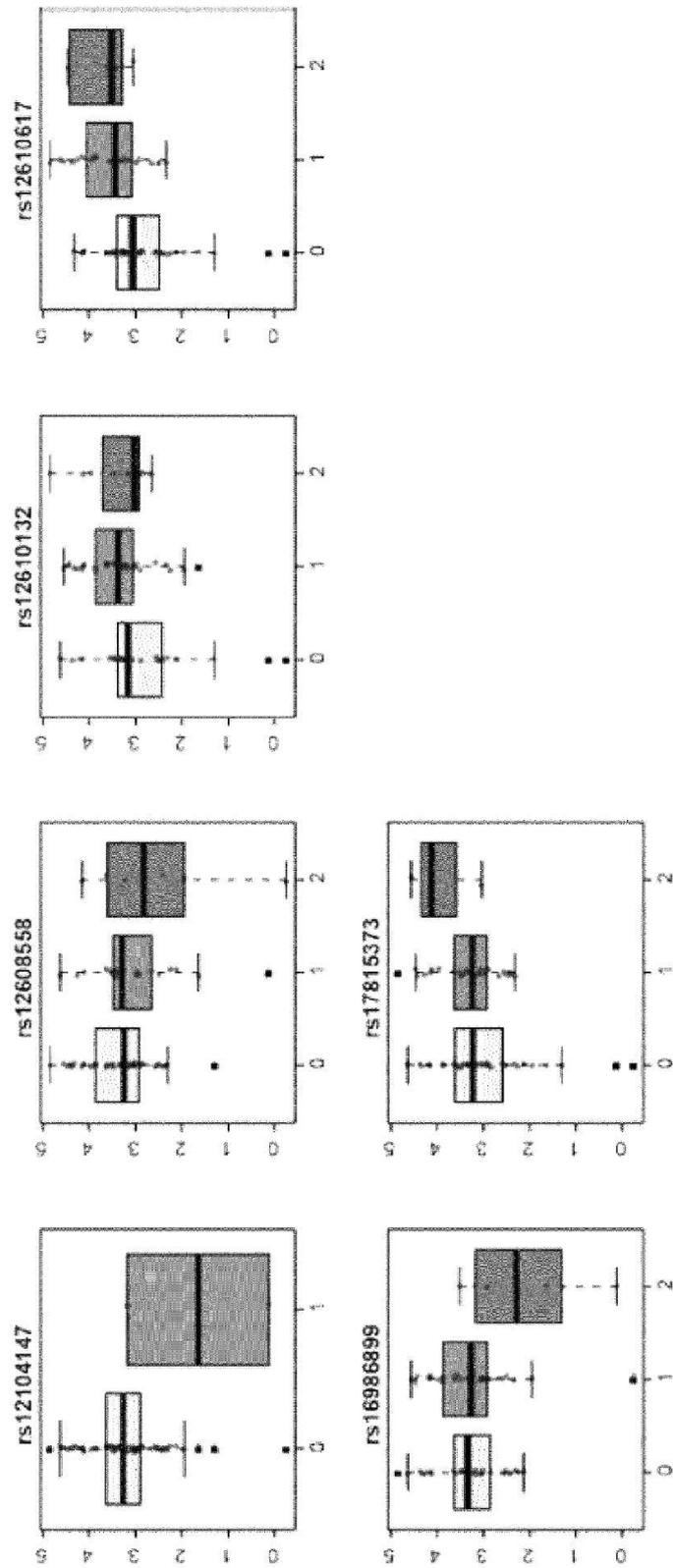


Figura 36D

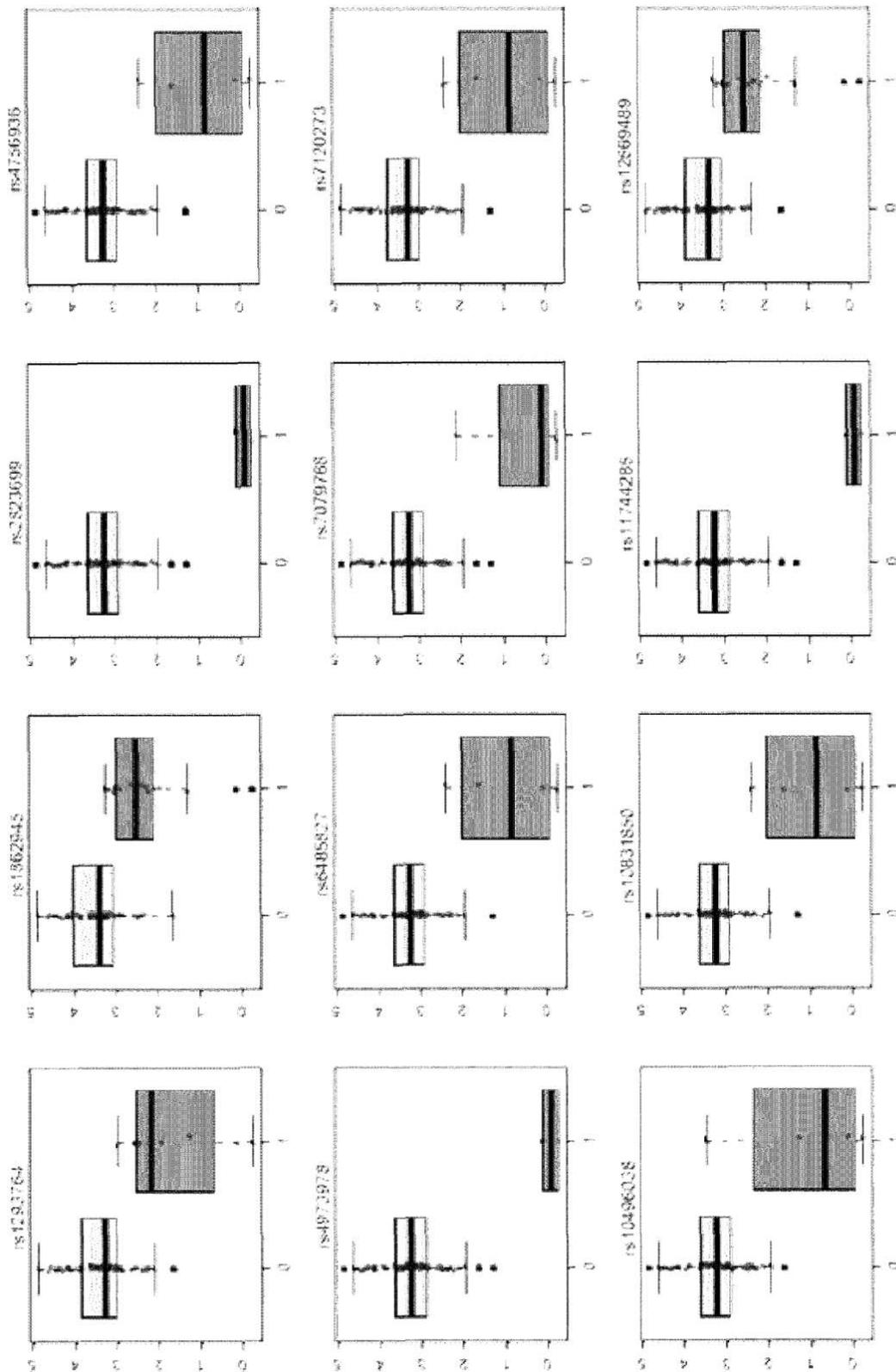


Figura 37

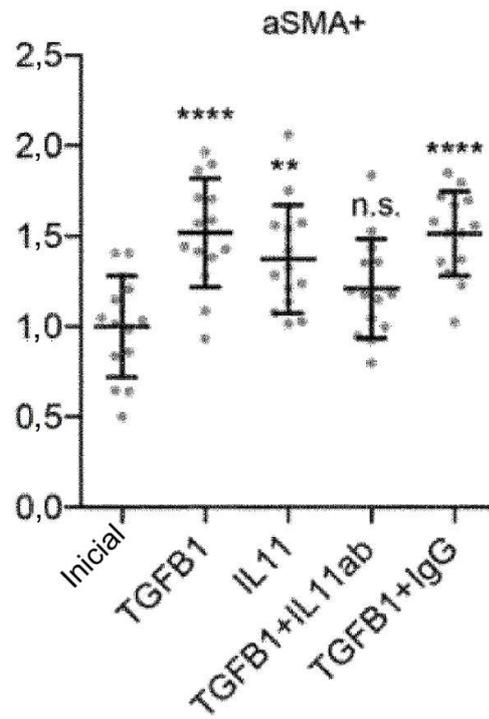


Figura 38A

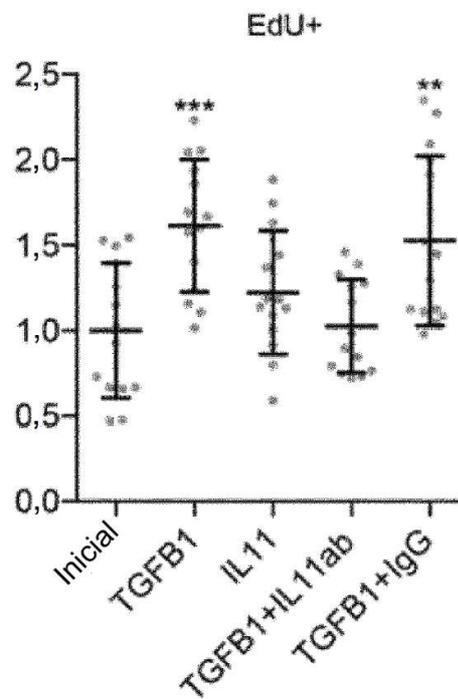


Figura 38B

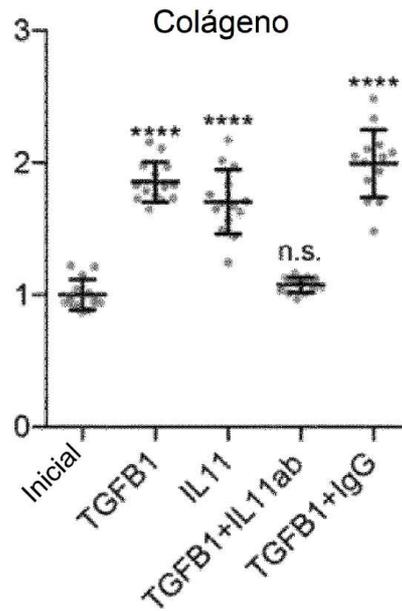


Figura 38C

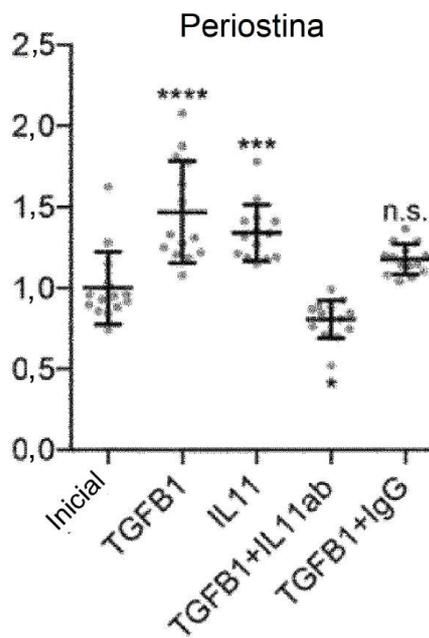


Figura 38D

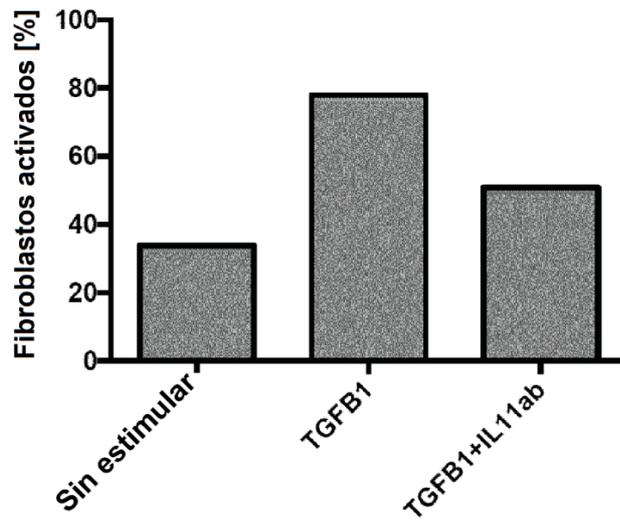


Figura 39

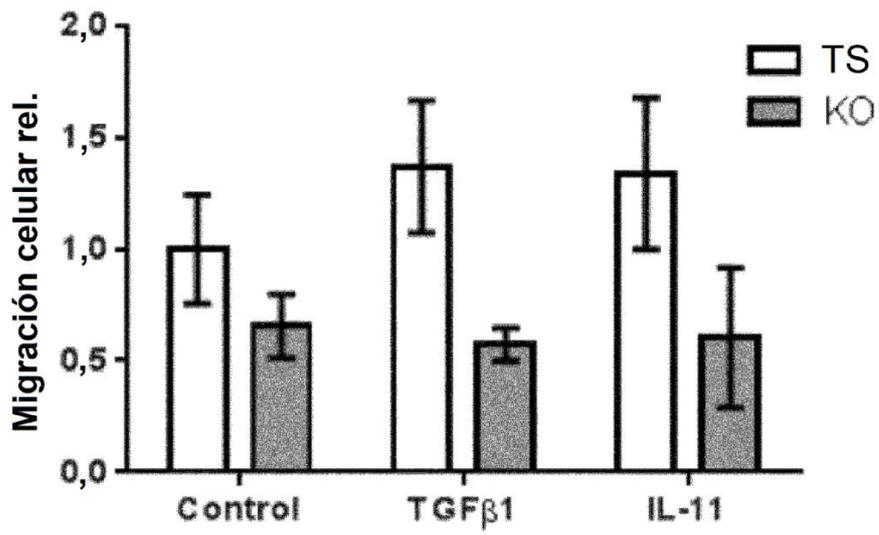


Figura 40