



УКРАЇНА

(19) UA (11) 80275 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 38/20

A61K 39/395

A61P 7/02 (2007.01)

A61P 9/00

A61P 9/10 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА IL-18 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ПЕРИФЕРИЧНИХ СУДИН (ВАРІАНТИ), ЗАСТОСУВАННЯ ВЕКТОРА (ВАРІАНТИ)

1

2

(21) 20041008590

(22) 13.03.2003

(24) 10.09.2007

(86) РСТ/ЕР03/50061, 13.03.2003

(31) 02100290.2

(32) 22.03.2002

(33) ЕР

(46) 10.09.2007, Бюл. № 14, 2007 р.

(72) Шватшко Йоланд, СН, Тедгі Алан, FR, Маллат Зіад, FR

(73) АППЛАЙД РЕЗЕЧ СІСТЕМЗ АРС ХОЛДІНГ Н.В., NL, ЕНСТІТЮ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЕ Е ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ МЕДІКАЛЬ, FR

(56) WO A1 0185201 15.11.2001

EP A 1101772 23.05.2001

(57) 1. Застосування інгібітора IL-18 для одержання ліків для лікування або профілактики захворювання периферичних судин, за винятком атеросклерозу.

2. Застосування за п. 1, при якому захворювання периферичних судин являє собою захворювання периферичних артерій.

3. Застосування за п. 1 або 2, при якому захворювання периферичних судин являє собою захворювання периферичних судин нижніх кінцівок.

4. Застосування за п. 1, при якому захворювання периферичних судин являє собою хворобу Бюргера (облітеруючий тромбангіт).

5. Застосування за п. 1, при якому захворювання периферичних судин являє собою периферичну ішемію.

6. Застосування за п. 5, при якому периферична ішемія являє собою ішемію кінцівки, зокрема критичну ішемію кінцівки.

7. Застосування за будь-яким з пунктів 1-6, при якому інгібітор IL-18 вибраний з інгібітора каспази-1 (ICE), антитіла проти IL-18, антитіла проти кожної із субодиниць рецептора IL-18, інгібітора шляху проведення сигналу IL-18, антагоніста IL-18, який конкурує з IL-18 і блокує рецептор IL-18, і зв'язувального IL-18 білка або його ізоформи, мутеїну, гібридного білка, функціонального похідного, активної фракції або циклічного похідного, які інгібують біологічну активність IL-18.

вної фракції або циклічного похідного, які інгібують біологічну активність IL-18.

8. Застосування за п. 7, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти IL-18.

9. Застосування за п. 7, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти рецептора α IL-18.

10. Застосування за п. 7, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти рецептора β IL-18.

11. Застосування за будь-яким з пунктів 7-10, при якому антитіло проти IL-18 являє собою гуманізоване або людське антитіло.

12. Застосування за п. 7, при якому інгібітор IL-18 являє собою білок, який зв'язує IL-18, або його ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональне похідне, активну фракцію або циклічне похідне, яке інгібують біологічну активність IL-18.

13. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, при якому інгібітор IL-18 глікозилований за одним або більше сайтами.

14. Застосування за п. 7, при якому гібридний білок являє собою білок злиття імуноглобуліну (Ig).

15. Застосування за п. 7, при якому функціональне похідне включає поліетиленгліколь, приєднаний до однієї або більше функціональних груп одного або більше бічних ланцюгів амінокислотних залишків.

16. Застосування інгібітора IL-18 для одержання ліків для лікування і/або профілактики кульгавості, викликаній захворюванням периферичних судин.

17. Застосування за п. 16, при якому інгібітор IL-18 вибраний з інгібітора каспази-1 (ICE), антитіла проти IL-18, антитіла проти кожної із субодиниць рецептора IL-18, інгібітора шляху проведення сигналу IL-18, антагоніста IL-18, який конкурує з IL-18 і блокує рецептор IL-18, і зв'язувального IL-18 білка або його ізоформи, мутеїну, гібридного білка, функціонального похідного, активної фракції або циклічного похідного, які інгібують біологічну активність IL-18.

18. Застосування за п. 17, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти IL-18.

(13) C2

(11) 80275

(19) UA

19. Застосування за п. 17, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти рецептора α IL-18.
20. Застосування за п. 17, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти рецептора β IL-18.
21. Застосування за будь-яким з пунктів 17-20, при якому антитіло проти IL-18 являє собою гуманізоване або людське антитіло.
22. Застосування за п. 17, при якому інгібітор IL-18 являє собою білок, який зв'язує IL-18, або його ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональне похідне, активну фракцію або циклічне похідне, які інгібують біологічну активність IL-18.
23. Застосування за будь-яким з пп. 16-22, при якому інгібітор IL-18 глікозильований за одним або більше сайтами.
24. Застосування за п. 17, при якому гібридний білок являє собою білок злиття імуноглобуліну (Ig).
25. Застосування за п. 17, при якому функціональне похідне включає поліетиленгліколь, приєднаний до однієї або більше функціональних груп одного або більше бічних ланцюгів амінокислотних залишків.
26. Застосування інгібітора IL-18 для одержання ліків для лікування або профілактики гангрен, викликаної захворюванням периферичних судин.
27. Застосування за п. 26, при якому інгібітор IL-18 вибраний з інгібітора каспази-1 (ICE), антитіла проти IL-18, антитіла проти кожної із субодиниць рецептора IL-18, інгібітора шляху проведення сигналу IL-18, антагоніста IL-18, який конкурує з IL-18 і блокує рецептор IL-18, і зв'язувального IL-18 білка або його ізоформи, мутеїну, гібридного білка, функціонального похідного, активної фракції або циклічного похідного, які інгібують біологічну активність IL-18.
28. Застосування за п. 27, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти IL-18.
29. Застосування за п. 27, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти рецептора α IL-18.
30. Застосування за п. 27, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти рецептора β IL-18.
31. Застосування за будь-яким з пунктів 27-30, при якому антитіло проти IL-18 являє собою гуманізоване або людське антитіло.
32. Застосування за п. 27, при якому інгібітор IL-18 являє собою білок, який зв'язує IL-18, або його ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональне похідне, активну фракцію або циклічне похідне, які інгібують біологічну активність IL-18.
33. Застосування за будь-яким з пп. 26-32, при якому інгібітор IL-18 глікозильований за одним або більше сайтами.

34. Застосування за п. 27, при якому гібридний білок являє собою білок злиття імуноглобуліну (Ig).
35. Застосування за п. 27, при якому функціональне похідне включає поліетиленгліколь, приєднаний до однієї або більше функціональних груп одного або більше бічних ланцюгів амінокислотних залишків.
36. Застосування інгібітора IL-18 для одержання ліків для запобігання ампутації кінцівки, викликаної захворюванням периферичних судин.
37. Застосування за п. 36, при якому інгібітор IL-18 вибраний з інгібітора каспази-1 (ICE), антитіла проти IL-18, антитіла проти кожної із субодиниць рецептора IL-18, інгібітора шляху проведення сигналу IL-18, антагоніста IL-18, який конкурує з IL-18 і блокує рецептор IL-18, і зв'язувального IL-18 білка або його ізоформи, мутеїну, гібридного білка, функціонального похідного, активної фракції або циклічного похідного, які інгібують біологічну активність IL-18.
38. Застосування за п. 37, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти IL-18.
39. Застосування за п. 37, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти рецептора α IL-18.
40. Застосування за п. 37, при якому інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти рецептора β IL-18.
41. Застосування за будь-яким з пунктів 37-40, при якому антитіло проти IL-18 являє собою гуманізоване або людське антитіло.
42. Застосування за п. 37, при якому інгібітор IL-18 являє собою білок, який зв'язує IL-18, або його ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональне похідне, активну фракцію або циклічне похідне, які інгібують біологічну активність IL-18.
43. Застосування за будь-яким з пп. 36-42, при якому інгібітор IL-18 глікозильований по одному або більше сайтах.
44. Застосування за п. 37, при якому гібридний білок являє собою білок злиття імуноглобуліну (Ig).
45. Застосування за п. 37, при якому функціональне похідне включає поліетиленгліколь, приєднаний до однієї або більше функціональних груп одного або більше бічних ланцюгів амінокислотних залишків.
46. Застосування експресуючого вектора, який включає кодуєчу послідовність інгібітора IL-18, для одержання ліків для лікування або профілактики захворювання периферичних судин, за винятком атеросклерозу.
47. Застосування експресуючого вектора, призначеного для індукції і/або посилення ендогенної продукції інгібітора IL-18 у клітині, для одержання ліків для лікування або профілактики захворювання периферичних судин, за винятком атеросклерозу.

Даний винахід відноситься до галузі судинних захворювань. Більш конкретно він відноситься до

застосування інгібітору IL-18 для лікування і/або профілактики захворювань периферичних судин.

Винахід додатково відноситься до застосування інгібітору IL-18 для запобігання ампутації.

Цитокін інтерлейкін 18 (IL-18) був спочатку описаний як інтерферон- γ (IFN- γ)-індукуючий фактор [Nakamura et al., 1989]. Він являє собою ранній сигнал при розвитку відповідей, опосередкованих Т-лімфоцитами-хелперами типу 1 (TH1). IL-18 діє разом з IL-12, IL-2, антигенами, мітогенами і, можливо, додатковими факторами при індукції продукції IFN- γ . IL-18 також збільшує продукцію GM-CSF і IL-2, потенціює анти-CD3-індуковану проліферацію Т-клітин і збільшує опосередкований Fas лізис природних кілерів.

Зрілий IL-18 продукується зі свого попередника за допомогою IL-1 β -перетворюючого ферменту (ICE, каспази-1).

Рецептор IL-18 складається, щонайменше, з двох компонентів, IL-18R альфа і IL-18R бета, що кооперативно беруть участь в зв'язуванні ліганду. У мишачих Т-клітинах, стимульованих IL-12, були знайдені високо- і низькоафінні сайти зв'язування IL-18 [Yoshimoto et al., 1998], що передбачає багатоланцюговий рецепторний комплекс. Дві рецепторні субодиниці, які ідентифіковані до теперішнього часу, належать до сімейства рецепторів IL-1 [Parnet et al., 1996; Kim et al., 2001]. Передача сигналу IL-18 включає активацію NF- κ B [DiDonato et al., 1997]. IL-18-рецепторний комплекс складається з двох рецепторних ланцюгів: лігандзв'язувального ланцюга, що позначається ланцюгом IL-18R α , ланцюга, що передає сигнал, який позначається ланцюгом IL-18R β . Ланцюг IL-18R альфа початково був виділений як білок клітинної поверхні, що зв'язується з радіоактивним IL-18; білок був очищений і була виявлена ідентичність його амінокислотної послідовності з описаним раніше orphan рецептором, що позначається як IL-1R-споріднений білок (IL-1Rrp) [Torigoe et al., 1997].

Нещодавно з сечі людини виділений розчинний білок, що володіє високою афінністю до IL-18, і кДНК людини і миші, а також клонований ген людини [Novick et al., 1999; патент WO 99/09063]. Білок був позначений як IL-18-зв'язувальний білок (IL-18BP).

IL-18BP не є позаклітинним доменом одного з відомих рецепторів IL-18, але являє собою секретований білок, що знаходиться у природній циркуляції. Він належить до нового сімейства секретованих білків, що додатково включає декілька білків, які кодуються поксвірусами [Novick et al., 1999]. IL-18BP з сечі, так само як рекомбінантний, специфічно зв'язує IL-18 з високою спорідненістю і модулює біологічну спорідненість IL-18.

Ген IL-18BP локалізований в хромосомі 11q13 людини, і в геномній послідовності 8,3 т.п.н. не знайдено екзону, що кодує трансмембранний домен. До теперішнього часу у людини знайдено чотири сплайсингових варіанти або ізоформи IL-18BP, що утворюються в результаті альтернативного сплайсингу мРНК. Вони позначені як IL-18BP a, b, c і d, причому всі мають однаковий N-кінець і відрізняються по C-кінцю [Novick et al., 1999]. Дані ізоформи відрізняються за своєю здатністю зв'язувати IL-18. Серед чотирьох ізоформ hIL-18BP a і c відомі як такі, що володіють нейтралізуючою здат-

ністю у відношенні IL-18. Ізоформа IL-18BP людини зв'язує IL-18 миші.

Порушення периферичних судин можуть бути артеріальними (оклюзивними або функціональними), венозними, поєднаними артеріовенозними (наприклад, артеріовенозна фістула) або лімфатичними. Оклюзивні захворювання артерій включають оклюзію периферичних артерій і хворобу Бюргера, названу також облітеруючий тромбангіїт. Функціональні порушення артерій можуть бути вазоспастичними (феномен і захворювання Рейно, акроціаноз) або вазодилаторними (еритромелалгія). Вони можуть бути вторинними по відношенню до локального дефекту кровоносних судин або до порушень в активності симпатичної нервової системи, або можуть супроводжувати органічне захворювання судин. Захворювання вен включають тромбоз вен і варикоз вен, поєднані артеріовенозні порушення включають артеріовенозну фістулу і лімфатичні порушення включають лімфедему і ліпедему.

Оклюзія периферичних артерій відноситься до оклюзії постачання кров'ю кінцівок звичайно через атеросклеротичні бляшки (атероми), тромб або емболію.

Оклюзія периферичних артерій може приводити до гострої або хронічної ішемії. Гостра ішемія викликається внаслідок відриву проксимальної атеросклеротичної бляшки, гострого тромбозу при попередньому атеросклеротичному захворюванні, емболії серця, аорти або інших великих судин, або розриву аневризми. Хронічна ішемія викликається внаслідок поступового збільшення атероматозної бляшки.

Тривале збільшення вмісту гомоцистеїну в крові при пошкодженні ендотеліальних клітин викликає схильність до передчасного атеросклерозу аорти і її гілок, периферичних артерій, артерій мозку і, можливо, коронарних артерій. Хоча рівень гомоцистеїну звичайно збільшується у зв'язку з іншими факторами ризику, вони можуть бути модифіковані дієтою і додаванням вітаміну B.

Клінічні синдроми оклюзії артерій залежать від залучених судин, міри обструкції, швидкості прогресії оклюзії і можливостей наявності адекватного коллатерального току.

Гостра оклюзія характеризується симптомами, які включають раптове виникнення сильного болю, холодність, задубіння і блідість кінцівки. Кінцівка стає холодною і блідою, і пульсація відсутня дистальніше обструкції. Гостра оклюзія може викликати тяжку ішемію, що виявляється втратою сенсорних і моторних функцій і в кінцевому результаті (після 6-8 годин) хворобливим затвердінням м'язів при пальпації.

При хронічній оклюзії симптоми відносяться до прихованого розвитку тканинної ішемії. Первинний симптом являє собою переміжну кульгавість. Симптомами кульгавості є біль, тупий біль, судороги або почуття втоми при ходьбі. Дані симптоми є найбільш звичайними в ікрі, але можуть з'являтися в стопі, стегні, боці або сідницях.

У кінцевому результаті ішемічний біль може наступати в стані спокою, починаючись в найбільш дистальних частинах кінцівки у вигляді сильного

болю, який не зменшується, що посилюється при піднятті і часто не дає заснути.

Рівень артеріальної оклюзії і локалізація переміжної кульгавості тісно корелюють, наприклад, аортоклубова оклюзія часто викликає кульгавість в сіднищах, боку і стопах, і стегова пульсація знижена або відсутня. При стегово-підколінній оклюзії кульгавість типова в ікрі і вся пульсація нижче стегна відсутня. У хворих з мікроангіопатією (наприклад, при облітеруючому тромбоангіїті, цукровому діабеті) стегово-підколінна пульсація може бути присутньою, але пульсація в стопі відсутня. Блідість залученої стопи через від 1 до 2хв. після підняття, що змінюється залежним почервонінням, допомагає підтвердити артеріальну недостатність. Залежний час наповнення вен після підняття перевищує нормальну межу в 15сек. Якщо симптоми кульгавості існують при хорошій дистальній пульсації, як диференціальний діагноз повинен розглядатись спінальний стеноз.

Стопа з тяжкою ішемією є хворобливою, холодною і часто заляккою. У хронічних випадках шкіра може бути сухою і шорсткою з поганим ростом нігтів і волосся. По мірі посилювання ішемії може з'явитись покриття виразками (звичайно на великому пальці або п'ятці, іноді на носі), особливо після місцевої травми. Набряк звичайно не виникає доти, доки хворий тримає ногу в залежному положенні для полегшення болю, однак нога з тяжкою ішемією може бути атрофічною. Більш протяжна оклюзія може створювати ризик для життєздатності тканини, приводячи до некрозу або гангрені. Ішемія з почервонінням, болем і набуханням залежної стопи може імітувати целюліт або венозну недостатність. Артеріальні неінвазивні тести можуть прояснити діагноз.

Серед захворювань периферичних судин хвороба Бюргера (облітеруючий тромбангіїт) являє собою облітеруюче захворювання, що характеризується запальними змінами в дрібних і середніх артеріях і венах.

Хвороба Бюргера виникає у курців сигарет, переважно у чоловіків від 20 до 40 років. Тільки приблизно у 5% випадків хвороба виникає у жінок. Частота діагнозу в останні роки суттєво знижується через краще розуміння клінічних і ангіографічних характеристик даного захворювання, що відрізняють його від облітеруючого артеріосклерозу.

Хоча причина залишається невідомою, хвороба Бюргера не зафіксована у некурящих, що дозволяє розглядати куріння сигарет як первинний етіологічний фактор, ймовірно у вигляді гіперчутливості уповільненого типу або токсичного ангіїту. Облітеруючий тромбангіїт може бути реакцією на пухотку у індивідуумів з конкретним фенотипом через суттєве переважання HLA-A9 і HLA-B5 у індивідуумів із захворюванням; або аутоімунним порушенням з опосередкованою клітинною відповіддю чутливістю до колагену людини типів I і III, які є складовими кровоносних судин.

На відміну від атеросклерозу хвороба Бюргера не залучає коронарних артерій.

У захворювання залучаються дрібні і середні артерії і часто поверхневі вени кінцівок сегментоподібним чином. Рідко при захворюванні, що дале-

ко зайшло, уражуються судини інших частин тіла. Патологічний вияв полягає в негнійному панартеїті або панфлебії з тромбозом залучених судин. Проліферація ендотеліальних клітин та інфільтрація шару інтими лімфоцитами настає при гострому пошкодженні, але внутрішня еластична мембрана є інтактною. Тромб стає організованим і пізніше проходимость судин відновлюється не повністю. Середня оболонка судини добре захищена, але може інфільтруватись фібробластами. Оскільки адвентицій звичайно більш інтенсивно інфільтрується фібробластами, при більш пізніх порушеннях виявляється періартеріальний фіброз, в який можуть також залучатись прилеглі вена і нерв.

Симптоми і ознаки є такими артеріальної ішемії і поверхневого тромбофлебиту. Поява є поступовою, починаючись з найбільш дистальних судин верхніх і нижніх кінцівок і прогресуючи проксимально, завершуючись дистальною гангrenoю. Хворий може скаржитись на мерзлякуватість, задушіння, поколювання або печіння перед появою об'єктивних симптомів захворювання. Загальним є феномен Рейно. У залученій кінцівці виникає переміжна кульгавість (звичайно в склепінні стопи або носі, але рідше руці, плечі або стегні). Біль є постійним при більш тяжкій ішемії, наприклад, в передгангренозній стадії і при покритті виразками або гангрені. Часто підвищена активність симпатичної нервової системи виявляється мерзлякуватістю, надмірною пітливістю і ціанозом залученої кінцівки, ймовірно, що викликаються сильним постійним болем.

Ішемічне покриття виразками і гангрена звичайно одного або більше пальців може наступати на ранній стадії захворювання, але не гостро. Неінвазивні дослідження показують сильне зниження кровотоку і тиску в уражених пальцях ніг, стопі і пальцях. Захворювання прогресує проксимально.

Іншим захворюванням периферичних судин є периферичне захворювання артерій, при якому у хворих із захворюванням периферичних артерій нижньої кінцівки (PAD) захворювання може прогресувати до тяжкої загрозливої життєздатності тканин ноги ішемії. Ішемічний біль в спокої, покриття виразками, що не загоюються, і гангрена, всі є передвісниками поганого кінця. Дані хворі схильні до високого ризику втрати ноги. Для врятування ноги і збереження загального здоров'я потрібне швидке визначення і оцінка важкості ішемії ноги з подальшою ефективною ревазуляризациєю.

Хронічна критична ішемія ноги є кінцевим результатом оклюзивного захворювання артерій, частіше за все атеросклерозу. У доповнення до атеросклерозу в поєднанні з гіпертензією, гіперхолістеринемією, курінням сигарет і діабетом менш часті причини хронічної критичної ішемії ноги включають захворювання Бюргера або облітеруючий тромбангіїт і деякі форми артеріїту.

Розвиток хронічної критичної ішемії ноги звичайно пов'язаний з локалізованою в декількох місцях артеріальною обструкцією, що сильно знижує потік крові до тканин. Критична тканинна ішемія клінічно виявляється як біль в спокої, рани, що не

загоюються, (через збільшені метаболічні потреби загоєння ран) або некроз тканин (гангрена).

Ішемічний біль в спокої класично описується як пекучий біль у подушечці стопи і пальцях ноги, який посилюється вночі, коли хворий знаходиться в ліжку. Ішемічний біль в спокої локалізований в стопі, де тканина найдалше від серця і дистальніше оклюзії артерій. Рани, що не загоюються, звичайно знаходяться в ділянках травми стопи, викликані неправильно підганим взуттям або пошкодженням. Рана звичайно розглядається як така, що не загоюється, якщо вона протягом від чотирьох до 12 тижнів не здатна відповідати на консервативне лікування, таке як регулярні зміни пов'язок, уникнення травми, лікування інфекції і видалення некротичної тканини.

Гангрена звичайно локалізується на пальцях ноги. Вона розвивається, коли постачання кров'ю є таким низьким, що настільки час спонтанний некроз в більшості погано перфузованих тканин.

У той час як ретельно виконана консервативна терапія може допомогти багатьом хворим з критичною ішемією ноги, тяжка природа їх захворювання може привести до розгляду питання про оперативне втручання. Хірургічні втручання включають ревазуляризацию або ампутацію. Якщо хворий хоче піти на ревазуляризацию, і він є прийнятним кандидатом на операцію, для додаткової оцінки і планування ревазуляризації часто виконують артеріографію. У деяких центрах як альтернативу або доповнення до артеріографії застосовують магніторезонансну ангіографію для зведення до мінімуму ризику експозиції з барвником. Збереження ноги за допомогою ревазуляризації є рентабельним, веде до кращої якості життя для більшості хворих і пов'язане з меншою періопераційною захворюваністю і смертністю, ніж ампутація. Збереження ноги повинне бути метою для більшості хворих з хронічною критичною ішемією ноги.

Здійсненність ревазуляризації визначається за артеріографічними даними, а також доступністю шунтування. Ангіопластика або введення стенту, або обидва способи є найбільш успішними при коротких, проксимальних пошкодженнях, таких як такі, що є у хворих з кульгавістю, але вони навряд чи будуть бути єдиним необхідним лікуванням у випадку виникнення критичної ішемії ноги через багаторівневу природу оклюзивного захворювання артерій. Ідеальним обхідним шляхом є велика підшкірна вена, але інші обхідні шляхи включають малі підшкірні вени, плечові вени або протезний обхідний шлях. При більшості серій хірургічних втручань трирічна міра проходимості обхідного шляху артерій ікри варіює від 40 процентів для протезних шунтів до 85 процентів для шунтів підшкірних вен. Для порівняння дослідження консервативної терапії дали успішний результат у від 25 до 49 процентів з ранами, що не загоюються, і від 50 до 80 процентів у поліпшенні ішемічного болю в спокої.

Деяким хворим, таким як ті, що мають численний некроз тканини, загрозову життю інфекцію або пошкодження, що не піддаються ревазуляризації, може бути показана первинна ампутація.

Рішення простежувати стан хворого з настороженим очікуванням і консервативним лікуванням або провести ревазуляризацию або ампутацію залежить від точної оцінки супутніх ризиків і переваг хірургічного втручання по відношенню до консервативного лікування.

Більш важливо, що це залежить від тлумачення хворим інвазивності або правомірності доступних варіантів вибору. Навіть хворі, не здатні ходити через свій стан, можуть розглядати ампутацію не придатною, і не всі хворі мотивовані виконувати роботу, необхідну для реабілітації після ампутації. Якщо прийняте рішення ампутувати, то рівень ампутації повинен бути таким, щоб мати найбільшу імовірність загоєння, в той же час даючи хворому максимальний шанс функціональної реабілітації.

Діагноз хронічної критичної ішемії кінцівки включає маніфестацію болю в спокої, рани, що не загоюються, і гангрену. Ішемічний біль в спокої звичайно описують як пекучий біль в склепінні або дистальній частині стопи, який виникає, коли хворий знаходиться в лежачому положенні, але ослаблюється, коли хворий повертається в положення, в якому стопи знаходяться в робочому стані. Об'єктивні гемодинамічні параметри, які підтверджують діагноз критичної ішемії кінцівки, включають кісточно-плечовий індекс 0,4 або менше, систолічний тиск в кісточки 50мм ртутного стовпа або менше, або систолічний тиск в пальці стопи 30мм ртутного стовпа або менше. Втручання може включати консервативну терапію, ревазуляризацию або ампутацію. Прогресуюча гангрена, рани, що швидко збільшуються, або постійний ішемічний біль в спокої можуть означати загрозу для кінцівки і передбачають необхідність ревазуляризації у хворих, що не мають заборонних оперативних ризиків. Імпланти шунтів звичайно потрібні через багаторівневу і дистальну природу звуження артерій при критичній ішемії кінцівки. Хворі діабетом частіше інших хворих схильні до дистального захворювання і менше підходять для імплантації шунта. У порівнянні з ампутацією ревазуляризация є більш рентабельною і пов'язана з меншою періопераційною захворюваністю і смертністю. Збереження кінцівки повинно бути метою для більшості хворих з критичною ішемією кінцівки.

У наш час основне лікування захворювань периферичних судин включає інвазивне лікування, таке як ангіопластика навіть ампутованої кінцівки. Ідентифікація ліків, які стимулюють периферичну неовазуляризацию, не збільшуючи прогресію атеросклеротичної бляшки, має істотне терапевтичне значення в даній галузі медицини.

Винахід ґрунтується на даних про те, що інгібітор IL-18 стимулює неовазуляризацию після індукції периферичної ішемії на експериментальній моделі на тваринах. Неовазуляризация відбувалася у зв'язку з активацією VEGF7 Act сигналізації і супроводжується підвищенням мобілізації і диференціювання клітин-попередників ендотелію в кістковому мозку.

На основі даних результатів пропонуються нові терапевтичні підходи для лікування або профілактики захворювань периферичних судин, для яких необхідна нео- або ревазуляризация.

Винахід, отже, відноситься до застосування інгібітору IL-18 для лікування і/або профілактики захворювань периферичних судин, зокрема, периферичної ішемії.

Винахід додатково відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання ліків для лікування і/або профілактики кульгавості і гангрені.

Більш того винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання ліків для запобігання ампутації, зокрема, ампутації кінцівки.

Застосування експресуючого вектора, що включає кодуєчу послідовність інгібітору IL-18, а також застосування експресуючого вектора для індукції і/або підвищення ендогенної продукції інгібітору IL-18 в клітині для лікування або профілактики захворювань периферичних судин також входить в об'єм даного винаходу.

Винахід далі відноситься до способу лікування захворювань периферичних судин, що включає введення хазяїну, який потребує цього, ефективної інгібуючої кількості інгібітору IL-18.

Фіг.1: показує А) типову мікроангіографію правої ішемічної і лівої неішемічної задніх кінцівок через 3 і 28 днів після оклюзії стегнової артерії у миші. В) показує ангіографічний показник ішемії/неішемії у мишей, лікованих pcDNA3-mIL18BP (IL-18BP) або пустою плазмідною (контроль) протягом 3 або 28 днів. Величини являють собою середнє \pm ст.пом.середн., $n=7$ на групу. $**p<0,01$ у порівнянні з контрольними мишами.

Фіг.2: показує А) індуковані ішемією зміни в кровотоці задньої кінцівки, що прослідковуються *in vivo* за допомогою візуалізації зображення лазерною доплерівською перфузією перфузії у мишей, лікованих pcDNA3-mIL18BP (IL-18BP) або пустою плазмідною (контроль). На зображеннях, що кодуються кольором, нормальна перфузія зображена червоним кольором, значне зниження кровотоку ішемічної задньої кінцівки зображене синім кольором. В) Кількісна оцінка кровотоку, виражена у вигляді відношення кровотоку в ішемічній кінцівці до такого в неішемічній кінцівці. Величини являють собою середнє \pm ст.пом.середн., $n=7$ на групу. $**p<0,01$ у порівнянні з контрольними мишами.

Фіг.3: показує А) типовий вміст білка VEGF при імуноблотингу в неішемічній та ішемічній лапі через 28 днів після оклюзії стегнової артерії. В) Кількісна оцінка рівня білка VEGF, виражена у вигляді відношення вмісту білка в ішемічній кінцівці до такого в неішемічній кінцівці. Величини являють собою середнє \pm ст.пом.середн., $n=7$ на групу. $**p<0,01$ у порівнянні з неішемічним контролем і $\dagger p<0,05$ у порівнянні з ішемічним контролем.

Фіг.4: показує А) типовий вміст білка фосфо-Акт при імуноблотингу в неішемічній та ішемічній лапі через 28 днів після оклюзії стегнової артерії. В) Кількісна оцінка рівня білка фосфо-Акт, виражена у вигляді відношення вмісту білка в ішемічній кінцівці до такого в неішемічній кінцівці. Величини являють собою середнє \pm ст.пом.середн., $n=7$ на групу. $*p<0,05$, $**p<0,01$ у порівнянні з неішемічним контролем і $\dagger p<0,05$ у порівнянні з ішемічним контролем.

Фіг.5: А) типові зображення ЕРС (клітин-попередників ендотелію), виділених з кісткового

мозку мишей без лігатури стегнової артерії (хибнооперованих) і мишей, лікованих pcDNA3-mIL18BP (IL-18BP) або пустою плазмідною (контроль). ЕРС характеризувались як адгезивні клітини з подвійним позитивним фарбуванням на AcLDL-Dil і фактор Віллебранда (vWF), В) Кількісна оцінка двічі позитивних клітин у мишей, лікованих pcDNA3-mIL18BP або пустою плазмідною. Величини являють собою середнє \pm ст.пом.середн., $n=5$ на групу. $***p<0,001$ у порівнянні з контрольними мишами, і $\dagger\dagger\dagger p<0,001$ у порівнянні з мишами без лігатури стегнової артерії (хибнооперовані).

Даний винахід ґрунтується на даних про те, що інгібітори IL-18 значно збільшують постішемічний ангіогенез після ішемії кінцівки, не впливаючи на щільність судин в неішемічній кінцівці на *in vivo* моделі захворювання у мишей. Отже, у винаході пропонується новий терапевтичний підхід до лікування або профілактики захворювань периферичних судин, для яких потрібна підвищена перфузія тканини.

Винахід, таким чином, відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання ліків для лікування і/або профілактики захворювання периферичних судин.

Термін "профілактики" в контексті даного винаходу відноситься не тільки до повного запобігання певному ефекту, але і до будь-якого часткового або суттєвого запобігання, ослаблення, скорочення, зниження або зменшення ефекту до або на початку настання захворювання.

Термін "лікування" в контексті даного винаходу відноситься до будь-якого сприятливого ефекту на розвиток захворювання, включаючи ослаблення, скорочення, зниження або зменшення патологічного розвитку після настання захворювання.

Термін "захворювання периферичних судин", що застосовується тут, відноситься до захворювань або порушень, що вражають артерії, вени і лімфатичні судини кінцівок. Порушення периферичних судин можуть бути артеріальними (оклюзивними або функціональними), венозними, поєднаними артеріовенозними (наприклад, артеріовенозна фістула) або лімфатичними. Оклюзивні захворювання артерій включають оклюзію периферичних артерій і облітеруючий тромбангіїт. Функціональні порушення артерій можуть бути вазоспастичними (феномен і захворювання Рейно, акроціаноз) або вазодилататорними (еритромелалгія). Вони можуть бути також вторинними по відношенню до локального дефекту кровоносних судин або до порушень в активності симпатичної нервової системи, або вони можуть супроводжувати органічне захворювання судин. Захворювання вен включають тромбоз вен і варикоз вен, поєднані артеріовенозні порушення включають артеріовенозну фістулу, і лімфатичні порушення включають лімфедему і ліпедему.

Термін захворювання периферичних судин призначений для охоплення всіх медичних показань, захворювань, порушень або симптомів, описаних у "Відомому рівні техніки" вище.

Термін "інгібітор IL-18" в контексті даного винаходу відноситься до будь-якої молекули, що модулює продукцію і/або дію IL-18 таким чином,

що продукція і/або дія IL-18 ослабляється, редукується або частково, суттєво або повністю запобігається або блокується.

Інгібітор продукції може бути будь-якою молекулою, що негативно впливає на синтез, процесинг або дозрівання IL-18. Інгібітори, що розглядаються відповідно до винаходу, можуть бути, наприклад, супресорами генної експресії інтерлейкіну IL-18, антисмисловими мРНК, що знижують або запобігають транскрипції мРНК IL-18, або ведучими до деградації мРНК, білками, що порушують правильне укладання, або частково або суттєво запобігають секреції IL-18, протеазами, що викликають деградацію IL-18, після його синтезу, інгібіторами протеаз, що розщеплюють про-IL-18 для утворення зрілого IL-18, таких як каспаза-1 і тому подібне.

Інгібітором дії IL-18 може бути, наприклад, антагоніст IL-18. Антагоністи можуть або зв'язувати, або ізолювати саму молекулу IL-18 зі спорідненістю і специфічністю, достатньою для часткової або суттєвої нейтралізації IL-18 або сайта(тів) зв'язування IL-18, відповідального(них) за зв'язування IL-18 зі своїми лігандами (таким як, наприклад, його рецептори). Антагоніст може також інгібувати шлях передачі сигналу IL-18, який активується в клітинах при зв'язуванні IL-18 зі своїм рецептором.

Інгібіторами дії IL-18 можуть бути також розчинні рецептори IL-18 або молекули, що імітують рецептори, або агенти, що блокують рецептори IL-18, або антитіла до IL-18, такі як поліклональні або моноклональні антитіла, або будь-який інший агент або молекула, що запобігає зв'язуванню IL-18 зі своїми мішенями, знижуючи або запобігаючи внаслідок цього внутрішньо- або позаклітинні реакції, опосередковані IL-18.

У переважному здійсненні винаходу захворюванням периферичних судин є захворювання периферичних артерій.

«Захворювання периферичних артерій» являє собою порушення, що включає звуження артерій в будь-якому місці від рук до аорти і артерій ніг. Воно може виникати раптово або поступово і звичайно веде до ішемії (зниженій доставці кисню до ділянок, що забезпечується судинами).

Відповідно до даного винаходу переважно, щоб захворювання периферичних артерій стосувалось нижніх кінцівок. Захворювання периферичних артерій або оклюзія можуть бути хронічними або гострими. Захворювання периферичних артерій часто пов'язане з кульгавістю.

Отже, даний винахід додатково відноситься до застосування інгібітору IL-18 для лікування і/або профілактики кульгавості. Кульгавість являє собою біль в нозі, зокрема в ікрі, який приходить і веде до кульгавості. Кульгавість звичайно відчувається при ходьбі і затихає в спокої. Вона, отже, звичайно відноситься до кульгавості, що переважається. Природа звичайно переміжного болю при кульгавості зумовлена тимчасовим неадекватним постачанням киснем м'язів ноги. Слабке постачання киснем є результатом звуження або оклюзії артерій, які забезпечують ногу кров'ю. Це обмежує постачання киснем м'язів ноги і відчувається особливо тоді, коли потреба даних м'язів в кисні зростає при виконанні вправ або при ходьбі.

У переважному здійсненні винаходу захворюванням периферичних судин є облітеруючий тромбангіїт (хвороба Бюргера). «Хвороба Бюргера» являє собою облітеруюче захворювання, що характеризується запальними змінами у дрібних і середніх артеріях і венах, яке часто виникає у курців сигарет, переважно у чоловіків від 20 до 40 років.

У захворювання залучаються дрібні і середні артерії і часто поверхневі вени кінцівок сегментоподібним чином.

У додатковому переважному здійсненні захворюванням периферичних судин є периферична ішемія, зокрема ішемія кінцівок. «Ішемія» являє собою дефіцит постачання кров'ю, звичайно зумовленого оклюзією або травмою кровоносних судин. «Периферична ішемія» конкретно відноситься до ішемії кінцівок, тобто рук або ніг, яка веде до дефіциту постачання киснем відповідної тканини кінцівки.

У ще одному здійсненні даного винаходу ішемія кінцівок є критичною ішемією кінцівок. «Критична ішемія кінцівок» являє собою стан, при якому постачання кінцівки кров'ю є настільки низьким, що це загрожує життю. Наявність болю в спокої, покриття виразками або гангреною вказує на критичну ішемію кінцівки. Гангрена є терміном, що застосовується для опису омертвілої тканини, і часто виникає в результаті або в поєднанні з ішемією кінцівки. Ішемічна виразка викликається неадекватним постачанням кров'ю.

Критична ішемія кінцівки, включаючи гангрену або виразки, вимагає ревааскуляризації для запобігання ампутації кінцівки. Отже, даний винахід також відноситься до застосування інгібіторів IL-18 для лікування і/або запобігання гангрені або виразкам.

Віддаленим наслідком захворювання периферичних судин і, зокрема, периферичної ішемії може бути ампутація ураженої кінцівки, зокрема, ураженої нижньої кінцівки або стопи. Ревааскуляризація буде вести до реперфузії ураженої тканини і таким чином сприяти процесу загоєння.

Отже, винахід додатково відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання ліків для запобігання ампутації кінцівок, зокрема, нижньої кінцівки, стопи або пальця(ців) ноги.

У переважному здійсненні даного винаходу інгібітор IL-18 вибраний з інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл, направлених проти IL-18, антитіл, направлених проти будь-якої з рецепторних субодиниць IL-18, інгібіторів шляху проведення сигналу IL-18, антагоністів IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують рецептор IL-18, білків, які зв'язують IL-18, ізоформ, мутеїнів, гібридних білків, функціональних похідних, активних фракцій або їх циклічних похідних, інгібуючих біологічну активність IL-18.

Термін «білки, які зв'язують IL-18» застосовується тут як синонім «білка, який зв'язує IL-18» або «IL18BP». Він включає білки, які зв'язують IL-18, як визначено [в патенті WO99/09063 або в Novick et al., 1999], включаючи сплайсингові варіанти і/або ізоформи білків, які зв'язують IL-18, як визначено в Kirn et al., 2000, які зв'язуються з IL-18. Зокрема, ізоформи а і с IL-18BP людини застосовуються відповідно до даного винаходу. Білки, що застосо-

вуються в даному винаході, можуть бути глікозилізованими або неглікозилізованими, вони можуть походити з природних джерел, таких як сеча, або їх можна переважно одержувати рекомбінантним способом. Рекомбінантна експресія може бути створена у прокаріотних експресуючих системах, таких як *E. coli*, або в еукаріотних системах, і переважно в експресуючих системах ссавців. Клітинною лінією, яка особливо добре підходить для експресії білків ссавців, є лінія клітин яєчника китайського хом'ячка (СНО).

Термін «мутеїни», що застосовується тут, відноситься до аналогів IL-18BP або аналогів вірусного IL-18BP, в яких один або більш амінокислотних залишків природного IL-18BP або вірусного IL-18BP замінені відмінними амінокислотними залишками або видалені, або один або більше амінокислотних залишків додані до природної послідовності IL-18BP або вірусного IL-18BP без істотної зміни активності одержаних продуктів у порівнянні з диким типом IL-18BP або вірусним IL-18BP. Дані мутеїни одержують за допомогою відомих способів синтезу і/або сайт-направленого мутагенезу або будь-яким іншим відомим відповідним для цього способом.

Мутеїни відповідно до даного винаходу включають білки, що кодуються нуклеїновою кислотою, такою як ДНК або РНК, яка гібридується з ДНК або РНК, що кодує IL-18BP або кодує вірусний IL-18BP, [як описано в патенті WO 99/09063], в жорстких умовах. Термін «жорсткі умови» відноситься до гібридизації і подальших умов промивання, які фахівці в даній галузі техніки традиційно відносять до «жорстких». [Дивись Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, вище, Interscience, N.Y., §§6.3 і 6.4 (1987, 1992) і Sambrook et al., вище]. Не обмежуючись цим, приклади жорстких умов включають умови промивання при 12-20°C, нижче, розраховану T_m гібрида при дослідженні у, наприклад, 2×SSC і 0,5% ДДС-Na протягом 5 хвилин, 2×SSC і 0,1% ДДС-Na протягом 15 хвилин; 1×SSC і 0,5% ДДС-Na при 37°C протягом 30-60 хвилин і потім 0,1×SSC і 0,5% ДДС-Na при 68°C протягом 30-60 хвилин. Фахівці в даній галузі техніки розуміють, що жорсткість умов також залежить від довжини послідовностей ДНК, олігонуклеотидних зондів (таких як з 10-40 основ) або змішаних олігонуклеотидних зондів. Якщо застосовують змішані зонди, переважно застосовувати хлорид тетраметиламонію (TMAC) замість SSC. Дивись Ausubel, вище.

Будь-який такий мутеїн переважно має амінокислотну послідовність, що суттєво повторює таку IL-18BP або суттєво повторює таку вірусного IL-18BP, таку, щоб мати активність, порівнянну з IL-18BP. Однією активністю IL-18BP є його здатність зв'язувати IL-18. Доти, доки мутеїн володіє суттєвою зв'язувальною активністю у відношенні IL-18,

він може бути застосований для очищення IL-18, такого як за допомогою афінної хроматографії, і, таким чином, може розглядатись як такий, що має активність, по суті схожу з IL-18BP. Таким чином, може бути визначено чи має будь-який даний мутеїн по суті ту ж саму активність, що і IL-18BP, за допомогою рутинних експериментальних способів, що включають використання такого мутеїну, наприклад, в простому конкурентному сендвіч-методі для визначення буде чи ні він зв'язувати мічений відповідним чином IL-18, такому як радіоімунний аналіз або ІФА.

У переважному здійсненні будь-який такий мутеїн має, щонайменше, 40% ідентичність або гомологію з послідовністю або IL-18BP, або кодового вірусом гомологом IL-18BP, [як визначено в патенті WO 99/09063]. Більш переважно, щоб він мав, щонайменше, 50%, щонайменше, 60%, щонайменше, 70%, щонайменше, 80% або найбільш переважно, щонайменше, 90% ідентичність або гомологію з ними.

Мутеїни поліпептидів IL-18BP або мутеїни вірусних IL-18BP, які можуть бути використані відповідно до даного винаходу, або кодує їх нуклеїнова кислота включають обмежений набір значною мірою відповідних послідовностей як заміновальні пептиди або поліпептиди, які можуть бути одержані загальноприйнятим способом фахівцем в даній галузі техніки без надмірного експериментування на основі представлених тут вказівок і керівництва.

Переважними замінами для мутеїнів відповідно до даного винаходу є ті, які відомі як «консервативні» заміни. Консервативні амінокислотні заміни поліпептидів або білків IL-18BP або вірусних IL-18BP можуть включати взаємозамінні амінокислоти в межах групи, які мають по суті схожі фізико-хімічні властивості, так що заміна між членами групи збереже біологічну функцію молекули (Grantham, 1974). Ясно, що у визначених вище послідовностях можуть бути зроблені також вставки і делеції амінокислот без зміни їх функції, особливо, якщо вставки або делеції включають тільки декілька амінокислот, наприклад, нижче тридцяти, і переважно нижче десяти, і не видаляються або замінюються амінокислоти, які є критичними для функціональної конформації, наприклад, цистеїнові залишки. Білки і мутеїни, що одержуються за допомогою таких делецій і/або вставок, входять в об'єм даного винаходу.

Переважно, щоб групами взаємозамінних амінокислот були представлені в таблиці 1. Більш переважно, щоб групами взаємозамінних амінокислот були представлені в таблиці 2; і найбільш переважно, щоб групами взаємозамінних амінокислот були представлені в таблиці 3.

Таблиця 1
Переважні групи взаємозамінних амінокислот

Амінокислота	Група взаємозамінних амінокислот
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Таблиця 2
Більш переважні групи взаємозамінних амінокислот

Амінокислота	Група взаємозамінних амінокислот
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Таблиця 3
Найбільш переважні групи взаємозамінних амінокислот

Амінокислота	Група взаємозамінних амінокислот
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val

Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Приклади одержання заміни амінокислот в білках, які можуть бути застосовані для одержання мутеїнів поліпептидів або білків IL-18BP або мутеїнів вірусних IL-18BP для застосування в даному винаході, включають будь-які відомі стадії способу, такі як представлені [в патентах США 4959314, 4588585 і 4737462, що належать Mark et al; 5116943, Koths et al., що належить, 4965195, що належить Namen et al; 4879111, Chong, що належить et al; 5017691, що належить Lee et al]; і білки зі замінами лізином, представлені [в патенті США No.4904584 (Shaw et al)].

Термін «гібридний білок» відноситься до поліпептиду, що включає IL-18BP або вірусний IL-18BP, або мутеїну або його фрагменту, з'єднаному з іншим білком, який, наприклад, володіє тривалим часом знаходження в рідинах організму. Таким чином, IL-18BP або вірусний IL-18BP можуть бути з'єднані з будь-яким білком, поліпептидом і тому подібним, наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом. Термін "функціональні похідні", що застосовується тут, охоплює похідні IL-18BP або вірусного IL-18BP і їх мутеїни і гібридні білки, які можуть бути одержані з функціональних груп, які знаходяться у вигляді бічних ланцюгів на залишках N- або C-кінцевих груп, за допомогою способів, відомих в даній галузі техніки, і включені у винахід внаслідок того, що вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не порушують активність білка, яка в значній мірі схожа з активністю IL-18BP або вірусними IL-18BP і не надає токсичних властивостей композиціям, які їх містять.

Дані похідні можуть, наприклад, включати поліетиленгліколеві бічні ланцюги, які можуть маскувати антигенні сайти і підвищувати час перебування IL-18BP або вірусну IL-18BP в рідинах тіла. Інші похідні включають аліфатичні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп, одержані шляхом взаємодії з аміаком або з первинними або вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, утворені з ацильними частинами (наприклад, алканольними або карбоциклічними ароматичними групами), або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, таких серилових або треонілових залишків), утворені з ацильними частинами.

Як «активні фракції» IL-18BP або вірусного IL-18BP, мутеїнів і гібридних білків даний винахід охоплює будь-який фрагмент або попередників поліпептидного ланцюга білкової молекули окремо

або разом з асоційованими молекулами або приєднаними до них залишками, наприклад, цукровими або фосфатними залишками, або агрегати білкової молекули або цукрові залишки як такі, за тієї умови, що названа фракція володіє в значній мірі тією ж активністю, що IL-18BP.

У додатковому переважному здійсненні винаходу інгібітор IL-18 являє собою антитіло, направлене проти IL-18 або його рецептора, IL-18R. Відповідно до даного винаходу можуть застосовуватись антитіла, направлені проти будь-якої з субодиниць IL-18R, названих IL-18R α і β .

Антитіла згідно з винаходом можуть бути поліклональними або моноклональними, гібридними, гуманізованими або навіть повністю людськими. Реконбінантні антитіла і їх фрагменти відрізняються високою спорідненістю зв'язування IL-18 або IL-18R *in vivo* і низькою токсичністю. Антитіла, які можуть бути застосовані у винаході, відрізняються своєю високою здатністю до лікування хворих протягом періоду, достатнього для індукції від хорошої до прекрасної регресії або пом'якшення патогенного стану або будь-якого симптому або групи симптомів, що відносяться до патогенного стану, і низькою токсичністю.

Нейтралізуючі антитіла легко індукувати у тварин, таких як кролики, кози або миші, шляхом імунізації IL-18, IL-18R α або β . Імунізовані миші особливо придатні як джерела В-клітин для одержання гібридом, які в свою чергу культивують для одержання великих кількостей моноклональних антитіл проти IL-18.

Гібридні антитіла являють собою молекули імуноглобуліну, які відрізняються двома або більше сегментами або частинами, що беруть початок від різних видів тварин. Звичайно варіабельна ділянка гібридного антитіла походить від антитіла відмінного від людини ссавця, такого як моноклональне антитіло миші, а константна ділянка імуноглобуліну походить від молекули імуноглобуліну людини. Переважно, щоб обидві ділянки і їх поєднання мали низьку імуногенність, що вимірюється традиційним способом [Elliott et al., 1994]. Гуманізовані антитіла являють собою імуноглобулінові молекули, створені способами генної інженерії, в яких мишачі константні ділянки замінені відповідними людськими еквівалентами при збереженні мишачих антигензв'язувальних ділянок. Одержане мишаче-людське гібридне антитіло переважно має знижену імуногенність і поліпшену фармакокінетику у людини [Knight et al., 1993].

Таким чином, в додатковому переважному здійсненні антитіло проти IL-18 або IL-18R являє собою гуманізоване антитіло. Переважні приклади гуманізованих антитіл проти IL-18 [описані, наприклад, в Європейській патентній заявці EP 0974600].

У ще одному додатковому переважному здійсненні антитіло є повністю людським. Спосіб одержання людських антитіл детально [описаний, наприклад, в патентах WO00/76310, WO99/53049, патенті США 6162963 або AU5336100].

Один зі способів одержання повністю людських антитіл полягає у «гуманізації» гуморальної імунної системи миші, тобто одержанні ліній ми-

шей, здатних продукувати людський Ig (ксеномишей) шляхом введення локусів імуноглобуліну (Ig) людини мишам, у яких ендегенні гени були інактивовані. Локуси Ig являють собою комплекс, як у значенні їх фізичної структури, так і генної перестановки і процесів експресії, необхідних для одержання в кінцевому результаті імунної відповіді широкого спектра. Різноманітність антитіл первинно генерується комбінаторною перестановкою різних V, D і J генів, що знаходяться в локусах Ig. Дані локуси містять також вставні регуляторні елементи, які контролюють експресію антитіла, виключення алелей, зміну класу і дозрівання афінності. Введення незмінених трансгенів Ig людини мишам показало, що машинерія реконбінації у миші сумісна з генами людини. Більш того можуть бути одержані гібридом, які секретують антигенспецифічні hu-mAbs різних ізотопів шляхом імунізації ксеномишей антигеном.

Повністю людські антитіла і способи їх одержання відомі в даній галузі техніки [Mendez et al (1997); Buggemann et al (1991); Tomizuka et al., (2000) патент WO 98/24893].

В особливо переважному здійсненні даного винаходу інгібітор IL-18 являє собою IL-18BP або його ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональне похідне, активну фракцію або замкнене в кільце похідне. Дані ізоформи, мутеїни, гібридні білки або функціональні похідні зберігають біологічну активність IL-18BP, особливо здатність зв'язувати IL-18, і переважно володіють активністю, яка, по суті, щонайменше, рівна IL-18BP. Переважні активні фракції володіють активністю, яка вище активності IL-18BP, або мають інші переваги, такі як краща стабільність або менша токсичність або імуногенність, або їх легше одержувати у великій кількості або простіше очищати.

Послідовності IL-18BP і його сплайсингових варіантів/ізоформ можуть бути взяті з [патенту WO99/09063 або з публікації Novick et al., 1999, а також Kirn et al., 2000].

Функціональні похідні IL-18BP можуть бути кон'юговані з полімерами для поліпшення властивостей білка, таких як стабільність, період півжиття, біологічна доступність, стійкість в організмі людини або імуногенність. Для досягнення даної мети IL-18BP може бути з'єднаний, наприклад, з поліетиленгліколем (PEG). Приєднання поліетиленгліколю може бути здійснене відомими способами, [описаними, наприклад, в патенті WO 92/13095].

Таким чином, в переважному здійсненні даного винаходу інгібітори IL-18, зокрема IL-18BP, модифіковані поліетиленгліколем.

У додатковому переважному здійсненні винаходу інгібітор IL-18 включає імуноглобуліновий гібрид, тобто інгібітор IL-18 являє собою гібридний білок, що включає весь зв'язувальний IL-18 білок або його частину, який з'єднаний з суцільним імуноглобуліном або його частиною. Способи одержання імуноглобулінових гібридних білків добре відомі в даній галузі техніки, які [описані, наприклад, в патенті WO 01/03737]. Фахівець в даній галузі техніки повинен розуміти, що одержаний гібридний білок, винаходу зберігає біологічну акти-

вність IL-18BP, зокрема, здатність зв'язувати IL-18. Приєднання може бути прямим або за допомогою короткого лінкерного пептиду, який може бути таким коротким, як послідовність з від 1 до 3 амінокислотних залишків або більше, наприклад, довжиною від 13 до 20 амінокислотних залишків. Вказаний лінкер може бути, наприклад, трипептидом з послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met) або 13-членною амінокислотою лінкерною послідовністю, що включає Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Gly-Gly-Gln, вставленою між послідовністю IL-18BP і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний гібридний білок володіє поліпшеними властивостями, такими як збільшений час перебування в рідинах організму (період півжиття), підвищена специфічна активність, збільшений рівень експресії або полегшене очищення гібридного білка.

У переважному здійсненні IL-18BP з'єднаний з константною ділянкою молекули Ig. Переважно він з'єднаний з ділянками важкого ланцюга, такими як, наприклад, домени CH2 і CH3 IgG1 або IgG2 людини. Одержання специфічних гібридних білків, що включають IL-18BP і частину імуноглобуліну, [описане, наприклад, в прикладі 11 патенту WO 99/09063]. Для одержання гібридних білків згідно з даним винаходом також придатні інші ізоформи молекул Ig, такі як ізоформи IgG2 або IgG4 або інші класи Ig, наприклад, такі як IgM або IgA. Гібридні білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними.

У ще одному додатковому здійсненні винаходи інгібітор IL-18 застосовують в поєднанні з однією або більше молекулами, активними в клінічних умовах винаходу, такими як вазодилататори, блокатори Ca, аспірин, бета-блокатори і тому подібним. Наприклад, згідно з даним винаходом в поєднанні з інгібітором IL-18 можуть бути застосовані антагоністи TNF. Антагоністи TNF надають дію декількома шляхами. По-перше, антагоністи можуть зв'язувати або секвеструвати саму молекулу TNF з афінністю і специфічністю, достатніми для часткової або суттєвої нейтралізації епітопу або епітопів TNF, відповідальних за зв'язування з рецептором TNF (що далі тут позначаються як «секвеструючі антагоністи»). Секвеструючий антагоніст може бути, наприклад, антитілом, направленим проти TNF.

В альтернативному варіанті антагоністи TNF можуть інгібувати шлях сигналізації TNF, що активується рецептором поверхні клітини після зв'язування TNF (що далі тут позначаються як «антагоністи сигналізації»). Для терапії або профілактики захворювання периферичних судин придатні обидві групи антагоністів, окремо або разом, у поєднанні з інгібітором IL-18.

Антагоністи TNF легко виявляти і оцінювати звичайним скринінгом кандидатів за їх дією на активність природного TNF в чутливих клітинних лініях *in vitro*, наприклад, В-клітинах людини, в яких TNF викликає проліферацію і секрецію імуноглобуліну. Тест включає склад TNF при різному розведенні кандидата в антагоністи, наприклад, від 0,1 до 100-кратного по відношенню до молярної кількості TNF, що застосовується в тесті, і кон-

тролі без TNF або тільки антагоніста. [Tucci et al., 1992].

Секвеструючі антагоністи є переважними антагоністами TNF для застосування згідно з даним винаходом. Переважними серед секвеструючих антагоністів є ті поліпептиди, які зв'язують TNF з високою спорідненістю і володіють низькою імуногенністю. Особливо переважними є розчинні молекули рецептора TNF і нейтралізуючі антитіла проти TNF. Наприклад, в даному винаході придатні розчинні TNF-RI і TNF-RII. Особливо більш переважними антагоністами згідно з даним винаходом є укорочені форми даних рецепторів, які включають позаклітинні домени рецепторів або їх функціональні частини. Укорочені розчинні рецептори TNF типу I і типу II [описані, наприклад, в патенті EP914431].

Укорочені форми рецепторів TNF є розчинними і були виявлені в сечі і сироватці у вигляді 30кДа і 40кДа інгібуючих зв'язувальних TNF білків, які називають TBPI і TBPPII, відповідно [Engelmann et al., 1990]. Згідно з винаходом одночасне, послідовне або роздільне застосування інгібітору IL-18 з антагоністом TNF є переважним.

У додатковому переважному здійсненні антагоністом TNF, що підлягає застосуванню згідно з винаходом, є розчинний TNF-RI (TBPI) людини. Природні і рекомбінантні розчинні молекули рецептора TNF і їх одержання були [описані в Європейських патентах EP 308378, EP 398327 і EP 433900].

В даному винаході можуть бути також застосовані похідні, фрагменти, ділянки і біологічно активні частини рецепторних молекул, функціонально схожі з рецепторними молекулами. Такі біологічно активний еквівалент або похідне рецепторної молекули відносяться до тієї частини поліпептиду або послідовності, що кодує рецепторну молекулу, яка має достатній розмір і здатна зв'язувати TNF з такою спорідненістю, яка забезпечує інгібування або блокування взаємодії з мембранозв'язувальним рецептором TNF.

Інгібітор IL-18 може бути застосований одночасно, послідовно або роздільно з інгібітором TNF.

У додатковому переважному здійсненні даного винаходу інгібітор IL-18 застосовують в кількості від приблизно 0,01 до 100мг/кг або від приблизно 1 до 10мг/кг або від 2 до 5мг/кг.

Інгібітор IL-18 згідно з винаходом переважно вводять системно і переважно підшкірно або внутрішньом'язово. Його можна вводити щодня або через день. Склади з тривалим вивільненням дають можливість менш частого введення, такого як, наприклад, щотижневе.

Винахід додатково відноситься до застосування експресуючого вектора, що включає кодуєчу послідовність інгібітору IL-18, для одержання ліків для профілактики і/або лікування захворювання периферичних судин. Таким чином, генно-терапевтичний підхід розглядається як спосіб доставки інгібітору IL-18 до потребуючої його ділянки. Для лікування і/або профілактики захворювання периферичних судин вектор для генної терапії, що включає послідовність інгібітору IL-18, може бути ін'єктований, наприклад, безпосередньо в

хвору тканину, що дозволяє уникнути проблем, пов'язаних з системним введенням векторів генної терапії, таких як розбавлення векторів, взаємодія або направлена доставка в клітини або тканини-мішені і побічні ефекти.

Згідно з винаходом розглядаються також застосування вектора для індукції і/або підвищення ендогенної продукції інгібітору IL-18 в клітинах, які звичайно не експресують інгібітор IL-18, або тих, які експресують інгібітор в недостатній кількості. Вектор може включати регуляторні послідовності, що функціонують в клітинах, призначених для експресії інгібітору IL-18. Такими регуляторними послідовностями можуть бути, наприклад, промотори і енхансери. Регуляторна послідовність може бути далі введена в належний локус геному шляхом гомологічної рекомбінації, що забезпечує тим самим ефективно зв'язувальну регуляторну послідовність з геном, експресію якого необхідно індукувати або підвищити. Технологія звичайно позначається як "Активізація ендогенного гена" (EGA) і вона [описана, наприклад, в патенті WO 91/09955].

Фахівець в даній галузі техніки повинен розуміти, що за допомогою тієї ж самої технології можливе пряме вимкнення експресії IL-18 без застосування інгібітору IL-18. Для цього в локус гена IL-18 може бути введений негативний регуляторний елемент, подібний, наприклад, сайленсинговому елементу, що тим самим повинно вести до негативної регуляції або запобігання експресії IL-18BP. Фахівець в даній галузі техніки повинен розуміти, що така негативна регуляція або придушення експресії IL-18 надає ту ж дію, що і застосування інгібітору IL-18, в профілактиці і/або лікуванні захворювання.

Винахід додатково відноситься до застосування клітини, генетично модифікованої для продукції інгібітору IL-18 для одержання ліків для лікування і/або профілактики захворювання периферичних судин.

Інгібітор IL-18, призначений для застосування відповідно до даного винаходу, може переважно вводитись у вигляді фармацевтичної композиції, необов'язково у поєднанні з терапевтично ефективною кількістю інгібітору TNF або іншими ліками, ефективними у лікуванні або профілактиці захворювання периферичних судин.

Переважаючими активними інгредієнтами фармацевтичних композицій є IL-18BP і його ізоформи, мутеїни, гібридні білки, функціональні похідні, активні фракції або замкнені в кільце похідні, як описано вище.

Термін «фармацевтично прийнятний» призначений для включення будь-якого носія, який не надає впливу на ефективність вияву біологічної активності активного інгредієнта і який не є токсичним відносно хазяїна, якому його вводять. Наприклад, для парентерального введення активний білок (білки) може бути представлений у вигляді одиниці лікарської форми для ін'єкції в таких носіях, як сольовий розчин, розчин декстрази, розчин сироваткового альбуміну або розчин Рінгера.

Активні інгредієнти фармацевтичної композиції згідно з винаходом можуть вводитись індивідууму

багатьма шляхами. Шляхи введення включають внутрішньошкірний, черезшкірний (наприклад, у повільно вивільняючих складах), місцевий і інтраназальний шляхи. Може бути застосований будь-який інший терапевтично ефективний шлях введення, наприклад, всмоктування через епітеліальні або ендотеліальні тканини, або за допомогою генної терапії, при якій молекулу ДНК, що кодує активний агент, вводять хворому (наприклад, за допомогою вектора), що викликає експресію і секрецію активного інгредієнта *in vivo*. Крім того, білок (білки) згідно з винаходом можна вводити разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, такими як фармацевтично прийнятні поверхнево-активні речовини, наповнювачі, носії, розріджувачі і розчинники.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення активний білок (білки) може бути складений у вигляді розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку у поєднанні з фармацевтично прийнятним розчинником (наприклад, водою, розчином солі, розчином декстрази) і додатковими речовинами, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніто) або хімічну стійкість (наприклад, консервантами і буферами). Склад стерилізують за допомогою способів, що звичайно застосовуються.

Біологічна доступність активного білка (білків) згідно з винаходом може бути також поліпшена застосуванням процедур кон'югації, яка підвищує період півжиття молекули в організмі людини, наприклад, шляхом з'єднання молекули з поліетиленгліколем, [як описано в патентній заявці РТС WO 92/13095].

Терапевтично ефективна кількість активного білка (білків) повинна залежати від множини факторів, включаючи тип антагоніста, спорідненість антагоніста до IL-18, будь-яку залишкову цитотоксичну активність, що виявляється антагоністами, шлях введення, клінічний стан хворого (включаючи бажаність підтримки нетоксичного рівня ендогенної активності IL-18).

«Терапевтично ефективна кількість» є такою, яка при введенні інгібітору IL-18 приводить до інгібування біологічної активності IL-18. Доза, що вводиться індивідууму у вигляді однократної або множинних доз, повинна залежати від множини факторів, включаючи фармакокінетичні властивості інгібітору IL-18, шлях введення, стан хворого і його показники (стать, вік, маса тіла, здоров'я, зростання), вираженість симптомів, одночасне лікування, частота лікування і бажаний ефект. Корекція і зміна встановлених діапазонів дози знаходяться в руках фахівців в даній галузі техніки, як і *in vitro* і *in vivo* способи визначення інгібування IL-18 у індивідуума.

Згідно з винаходом інгібітор IL-18 застосовують в кількості від приблизно 0,001 до 100 мг/кг або від приблизно 0,01 до 10 мг/кг маси тіла або від приблизно 0,1 до 5 мг/кг маси тіла або від приблизно 1 до 3 мг/кг маси тіла або від приблизно 2 мг/кг маси тіла.

Шляхом введення, який є переважним згідно з винаходом, є підшкірне введення. Додатковим

переважним способом введення згідно з винаходом є внутрішньом'язове введення. Для введення інгібітору IL-18 безпосередньо до місця його дії переважним є також його місцеве введення.

У додаткових переважних здійсненнях інгібітор IL-18 вводять щодня або через день.

Щоденні дози звичайно дають у вигляді розділених доз або у формі з постійним вивільненням, ефективних для досягнення бажаних результатів. Друге або подальше введення можна здійснювати в дозі, яка є такою ж, меншою або більшою у порівнянні з вихідною або попередньою дозою, введеною індивідууму. Друге і подальше введення може бути зроблене під час або перед настанням захворювання.

Згідно з винаходом інгібітор IL-18 можна вводити профілактично або терапевтично індивідууму до, одночасно або послідовно з іншими терапевтичними схемами або агентами (наприклад, схемами введення множини ліків) в терапевтично ефективній кількості, зокрема, з інгібітором TNF і/або іншим захищаючим судини агентом. Активні агенти, які вводять одночасно з іншими терапевтичними агентами, можуть вводитись в тих же самих або різних композиціях.

Винахід додатково відноситься до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає суміш ефективної кількості інгібітору IL-18 і/або антагоніста TNF з фармацевтично прийнятним носієм.

Винахід додатково відноситься до способу лікування захворювання периферичних судин, що включає введення фармацевтично ефективної кількості інгібітору IL-18 необов'язково у поєднанні з фармацевтично ефективною кількістю антагоніста TNF хворому, який потребує цього.

Маючи тепер повністю розкритий даний винахід, фахівець в даній галузі техніки повинен розуміти, що те ж саме може бути здійснене в широкому діапазоні еквівалентних параметрів, концентрацій і умов без виходу за межі сутності і об'єму винаходу і без надмірного експериментування.

Хоча даний винахід був описаний в зв'язку з його конкретними здійсненнями, потрібно розуміти, що він може бути підданий додатковим модифікаціям. Дана заявка призначена для охоплення будь-яких варіацій, застосувань або пристосування винаходу, відповідно загалом до принципів винаходу і що включають такі відгалуження даного опису, які виникають у відомій або звичайній практиці в межах даної галузі техніки, до якої відноситься винахід, і які можуть бути застосовані до істотних особливостей, викладених тут вище, як це виходить з прикладеної формули винаходу.

Всі цитовані тут посилання, включаючи журнальні статті або реферати, опубліковані або неопубліковані патентні заявки США або іноземні заявки, опубліковані патенти США або іноземні патенти або будь-які інші посилання включені тут повністю як посилання, включаючи всі результати, таблиці, фігури і текст, представлені в цитованих посиланнях. Крім того, повний зміст посилань, цитованих в цитованих тут посиланнях, також повністю включені як посилання.

Посилання на стадії відомого способу, стадії традиційного способу, відомі способи або традиційні способи до жодної міри не означає, що будь-який аспект, опис або здійснення даного винаходу розкрито, порушено або передбачено в галузі техніки, що має до цього відношення.

Попередній опис конкретних здійснень повинен настільки повно виявити загальну природу винаходу, щоб інші змогли, застосовуючи знання в даній галузі техніки (включаючи зміст цитованих тут посилань), легко модифікувати і/або адаптувати для різного застосування такі конкретні здійснення без надмірного експериментування і без виходу із загальної концепції даного винаходу. Отже, маєтись на увазі, що така адаптація і модифікації знаходяться в межах значень еквівалентів розкритих здійснень, основаних на представлених тут вказівках і керівництві. Потрібно розуміти, що використані тут фразеологія і термінологія призначені для мети опису, але не обмеження, так що термінологію і фразеологію даного опису фахівець потрібно інтерпретувати в світлі представлених тут вказівок і керівництва у поєднанні зі знаннями фахівця в даній галузі техніки.

Приклади

Приклад 1: Інгібування IL-18 знижує периферичну ішемію

Способи:

Виклик ішемії задньої кінцівки

Для індукції односторонньої ішемії задньої кінцівки самців мишей лінії C57BL/6J піддавали хірургічній операції. Тварин анестезували інгаляцією ізофлурану. На праву стегнову артерію на 0,5 см вище її розділення на підшкірну і підколінну артерії накладали лігатуру. Мишей (по 7 тварин на групу) потім утримували при особливих вільних від патогенів умовах протягом 3 або 28 днів. Для оцінки ролі IL-18BP в індукованому ішемією ангіогенезі групу мишей ін'єктували 60 мкг експресійної плазмиди мишачого IL-18BP, pcDNA3-mIL18BP в обидва тибіальні краніальні м'язи, як описано раніше [Mallat et al., 2001]. Контрольним мишам ін'єктували ту ж дозу контрольної пустої плазмиди. Черезшкірні електричні імпульси (8 електричних імпульсів прямокутної форми 200 в/см з тривалістю 20 мсек при 2 Гц) наносили за допомогою електропультатора (Genetronics) із застосуванням двох плоских електродів з нержавіючої сталі, розміщених на відстані від 4,2 до 5,3 мм один від одного на кожній стороні лапи. Дану стратегію застосовували, оскільки раніше було показано, що вона підвищує рівень IL-18BP в плазмі, знижує активність IL-18 плазми та інгібує розвиток і прогресію атеросклеротичних бляшок [Mallat et al., 2001].

Кількісна оцінка ангіогенезу

Мікроангіографія

Щільність судин оцінювали мікроангіографією високого розділення в кінці періоду лікування, як описано раніше [Silvestre et al., 2000; Silvestre et al., 2001]. Коротко, мишей анестезували (інгаляція ізофлурану) і їм ін'єктували контрастуюче середовище (сульфат барію, 1 г/мл) через катетер, введений в черевну аорту. Зображення (по 3 на тварину), одержані за допомогою цифрового датчика рентгенівських променів, об'єднували для одер-

ження повної картини задніх кінцівок. Щільність судин виражали у вигляді процента пікселів зображення, зайнятих судинами в ділянці, що оцінюється. Зону кількісної оцінки обмежували місцем нанесення лігатури на стегнову артерію, коліном, краєм стегна і зовнішньою межею лапи.

Щільність капілярів

Мікроангіографічний аналіз проводили шляхом оцінки щільності капілярів в ішемічних і неішемічних м'язах, як описано раніше [Silvestre et al., 2000; Silvestre et al., 2001]. Заморожені зрізи тканини (7мкм) інкубували з моноклональним антитілом щура, направленим проти CD31 (20мкг/мл, Pham-ingen), для ідентифікації капілярів. Імунне фарбування виявляли за допомогою систем візуалізації авідин-біотин-пероксидаза хрону (елітний набір Vestastain ABC, Vector Laboratories). Щільність капілярів рахували у випадково вибраних полях певної ділянки із застосуванням програми Histolab (Microvision). Одержання зображення за допомогою лазерної доплерівської перфузії.

Для одержання функціонального доказу індукованих ішемією змін у васкуляризації були проведені експерименти з одержанням зображення за допомогою лазерної доплерівської перфузії, як описано раніше [Silvestre et al., 2000; Silvestre et al., 2001]. Коротко, перед одержанням зображення видаляли надлишок волосся з кінцівки за допомогою крему для видалення волосся, і мишей вміщували на майданчик, що підігрівається до 37°C для зведення до мінімуму відмінностей в температурі. Проте, для врахування змінних параметрів, включаючи світло і температуру навколишнього середовища, розраховану перфузію виражали у вигляді відношення в ішемічній і неішемічній лапі.

Статистичний аналіз

Результати виражені у вигляді середнє \pm ст.пом.сред. Для порівняння кожного з параметрів застосовували односторонній аналіз дисперсії ANOVA. Потім для ідентифікації тих групових відмінностей, які забезпечують значущі відмінності в ANOVA загалом, здійснювали порівняння за допомогою вторинного тесту з поправкою Бонферонні. Величину $p < 0,05$ розглядали як статистично значущу.

Результати:

Мікроангіографія

На 3 день відношення ангіографічних показників для ішемічна/неішемічна лапа не змінювались в жодній з груп (Фіг.1). Навпаки, на 28 день ангіографічний показник був збільшений в 1,6 рази у мишей, підданих лікуванню IL-18BP, у порівнянні з контролем ($p < 0,01$).

Щільність капілярів

Дані мікроангіографії були підтверджені аналізом щільності капілярів забарвленням CD31. На 28 день щільність капілярів ішемічної лапи контрольних мишей була нижчою, ніж в неішемічній лапі (415 ± 31 проти 688 ± 42 судин/мм², $p < 0,01$). Однак щільність капілярів ішемічної лапи мишей, підданих лікуванню IL-18BP, була значно вищою (1,4-кратне збільшення), ніж у контрольних мишей (588 ± 48 проти 415 ± 31 судин/мм², відповідно, $p < 0,01$), і не відрізнялась від рівня, що спостерігався в неішемічній лапі.

Одержання зображення за допомогою лазерної доплерівської перфузії.

Мікроангіографічні вимірювання і вимірювання щільності капілярів були пов'язані зі змінами у перфузії крові. Відновлення кровотоку в задній кінцівці відбувалось як у мишей, що піддавались, так і тих, що не піддавались лікуванню. Однак у мишей, що лікувались IL-18BP, було виявлене більше збільшення кровотоку (перфузії лапи) на 28 день у порівнянні з контрольними тваринами (в 1,5 рази, $p < 0,01$, Фіг.2).

Приклад 2: рівня білка VEGF, фосфо-Akt і eNOS

Спосіб:

Експресію VEGF, фосфо-Akt і eNOS (білка ендотеліальної синтази нітрокисиду) визначали в ішемічній і неішемічній лапах за допомогою імуноблотингу, як описано раніше [Silvestre et al., 2000; Silvestre et al., 2001].

Результати:

VEGF. На 3 день у всіх групах не спостерігалося змін в рівні білка VEGF при порівнянні ішемічної і неішемічної лап. На 28 день у контрольних мишей вміст білка VEGF в ішемічній лапі виявляв тенденцію до збільшення у порівнянні з неішемічною, але ця тенденція не досягала статистично значущого рівня. Навпаки, рівень білка VEGF ішемічної лапи був значно підвищений на 120% у мишей, що лікувались IL-18BP у порівнянні з контролем ($p < 0,05$) (Фіг.3).

Фосфо-Akt. На 3 день рівень білка фосфо-Akt не змінювався в ішемічній і неішемічній задній кінцівці, незалежно від лікування. На 28 день у контрольних мишей вміст білка фосфо-Akt підвищувався на 60% в ішемічній задній кінцівці у порівнянні з неішемічною ($p < 0,01$). Дане збільшення у вмісті фосфо-Akt ішемічної лапи подвоювалось у мишей, що лікувались IL-18BP (110% збільшення, $p < 0,05$ у порівнянні зі збільшенням в ішемічній лапі контрольних мишей) (Фіг.4).

eNOS. На 3 день вміст білка eNOS не змінювався в ішемічній ($107 \pm 8\%$ проти $103 \pm 24\%$) і неішемічній ($100 \pm 12\%$ проти $94 \pm 21\%$) лапах контрольних і тварин, що лікувались IL-18BP, відповідно. На 28 день у контрольних мишей рівень eNOS зростав на 55% в ішемічній лапі у порівнянні з неішемічною ($155 \pm 8\%$ проти $100 \pm 11\%$, відповідно, $p < 0,05$). Таке збільшення не змінювалось лікуванням IL-18BP ($160 \pm 12\%$, $P = 0,61$ у порівнянні з ішемічним контролем).

Приклад 3: Вплив IL-18BP на EPC (ендотеліальні клітини-попередники)

Способи:

Аналіз проточною цитометрією

Вважають, що клітини EPC походять від Sea-1-позитивних гематопоетичних клітин-попередників [Takahashi et al., 1999]. У зв'язку з цим за допомогою проточної цитометрії був визначений процент мононуклеарних клітин, які експресують маркерний для EPC білок Sca-1. Через сім днів після ішемії з периферичної крові (300мкл) і кісткового мозку мишей, що лікувались або пустою плазмідною pcDNAS, або плазмідною pcDNA3-mILISBP ($n = 5$ на групу) виділяли мононуклеарні клітини. Клітини кісткового мозку одержували про-

миванням великогомілкової і стегнової кісток. Мононуклеарні клітини низької щільності виділяли центрифугуванням в градієнті щільності фіколу. Після цього мононуклеарні клітини інкубували з кон'югованими з ізотіоціанатом флуоресцеїну (FITC) моноклональними антитілами проти Sca-1 (D7, BD Pharmingen). Як контроль служили антитіла ідентичного ізо типу.

Диференціальний аналіз EPC

Відразу після виділення $5 \cdot 10^6$ мононуклеарних клітин з кісткового мозку вміщували також на 35-мм чашки для клітинних культур, покриті вітронектином плазми щура (Sigma) і желатином (0,1%), і підтримували в базальному середовищі для ендотелію (EBM2, Bio Whittaker). Через 4 дні культивування неприкріплені клітини видаляли, а прикріплені клітини піддавали імунохімічному аналізу.

Для визначення захоплення міченого $1,1'$ -діоктадецил-3,3,3',3'-тетраметиліндокарбоціаніном ацетильованого ліпопротеїну низької щільності (AcLDL-Dil) клітини інкубували з AcLDL-Dil (Tebu) при 37°C протягом 1 години. Клітини потім фіксували 2% параформальдегідом, інкубували з первинним поліклональним антитілом кролика проти фактора Віллібранда (vWF) (DAKO) протягом 1 години і потім з міченим FITC моноклональним антитілом проти IgG кролика (H+L) протягом 30 хв. (Coulter). Клітини з подвійним забарвленням, позитивним у відношенні як AcLDL-Dil, так і vWF, розглядалися як EPC, і розраховували їх кількість на чашку. Кількість EPC на чашку оцінювалася трьома незалежними дослідниками шляхом підрахунку в трьох випадково вибраних високорепрезентативних полях. Результати потім виражали у вигляді процента від загальної кількості мононуклеарних клітин.

Результати:

Як вважають, EPC походять від Sca-1 позитивних мононуклеарних клітин [Takahashi et al., 1999]. Процент Sca-1 позитивних мононуклеарних клітин в периферичній крові залишався незмінним у мишей, що лікувались IL-18BP, у порівнянні з контрольними тваринами ($31,5 \pm 13\%$ проти $28,5 \pm 13\%$, відповідно). Схожим чином, загальна кількість Sca-1 позитивних мононуклеарних клітин, виділених з кісткового мозку, не розрізнялася у мишей, що лікувались IL-18BP, і контрольних тварин ($4,35 \pm 0,95\%$ проти $5,87 \pm 0,22\%$, відповідно). Більш того, лікування IL-18BP не впливало на загальну кількість мононуклеарних клітин периферичної крові або кісткового мозку (дані не показані).

EPC виділяли і культивували з мононуклеарних клітин кісткового мозку і характеризували як двічі забарвлені клітини, позитивні у відношенні AcLDL-Dil і vWF. Процент клітин з подвійним позитивним фарбуванням був майже невизначний у неішемічних тварин ($<5\%$, $n=4$). Ішемія спричиняла значне збільшення процента клітин з подвійним позитивним забарвленням для AcLDL-Dil і vWF ($48 \pm 3\%$, $p < 0,001$ у порівнянні з неішемічними тваринами). Даний ефект додатково збільшувався при лікуванні IL-18BP ($48,3\%$ у контролю проти $85 \pm 2\%$ у мишей, що лікувались IL-18BP, $p < 0,001$) (Fig.5). Таким чином, схоже, що лікування IL-18BP стимулює диференціювання мононуклеарних клі-

тин в EPC, але не збільшує кількість циркулюючих клітин-попередників.

Посилання

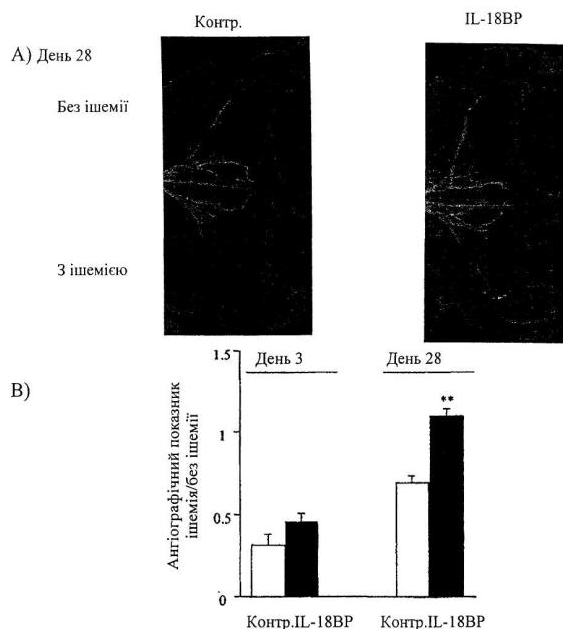
- Buggemann et al., Eur. J. Immunol. 21:1323-1326 (1991).
- DiDonato, JA, Hayakawa, M, Rothwarf, DM, Zandi, E and Karin, M. (1997). Nature 388, 16514-16517.
- Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., 1994, Lancet 344, 1125-1127.
- Engelmann, H., Novick, D, and Wallach, D., 1990, J.Biol.Chem. 265, 1531-1536.
- Grantham (1974), Science, 185, 862-864.
- Kirn SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello C A. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97: 1190-1195.
- Kim SH et al., J. Immuno. 2001, 166, pp.148-154.
- Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallion B, Moore MA, Vilcek J, Dad-dona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. Mol Immunol 1993 Nov 30: 16 1443-53.
- Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- Meldrum, D. R., Cleveland, J. C, Jr., Cain, B. S., Meng, X. & Harken, A. H. (1998) Ann Thorac Surg 65, 439-43.
- Mendez, M.M., Green, L.L., Corvalan, J.R.F., Jia X-C, Maynard-Currie, E.E., Yang, X-D., Gallo, M.L., Louie, D.M., Lee, D.V., Erickson, K.L., Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D.M., Fukushima, A., Hales, J.F., Finer, M.H., Davis, C.G., Zsebo, K.M. and Jakobovits, A. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice". Nature Genetics, 15, 146-56.
- Nakamura, K, Okamura, H, Nagata, K and Tamura, T. (1989). Infect. Immun. 57, 590-595.
- Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). Immunity 10,127-136.
- Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, and Sims, J ED1996), J. Biol. Chem. 271, 3967-3970.
- Silvestre, J.S., Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, DuvergerN, Branellec D, Tedgui A, Levy BI. 2000. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. Circ. Res. 87: 448-452.
- Silvestre, J.S., Mallat Z, Tamarat R, Duriez M, Tedgui A and Levy BI. 2001. Regulation of Matrix Metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: Role in ischemia-induced angiogenesis. Circ. Res. 89: 259-264.
- Takahashi, T., Kalka, C, Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., Asahara, T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med. 5:434-438.

18. Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Taniai, M., Kunikate, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fuji, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H. & Kurimoto, M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25737-25742.

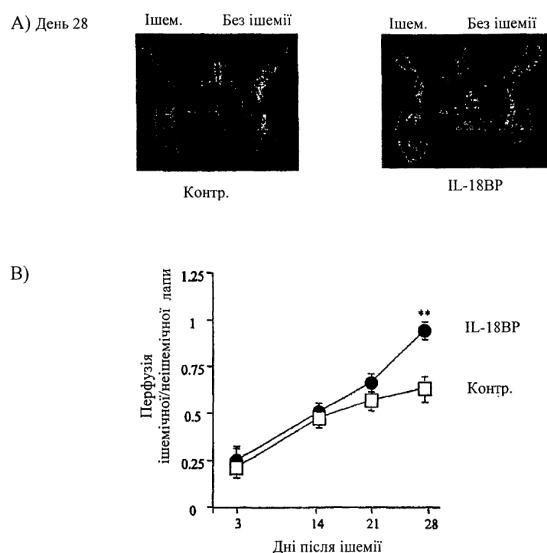
19. Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 (2000).

20. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zubler, R.H., 1992, *J. Immunol.* 148, 2778-2784.

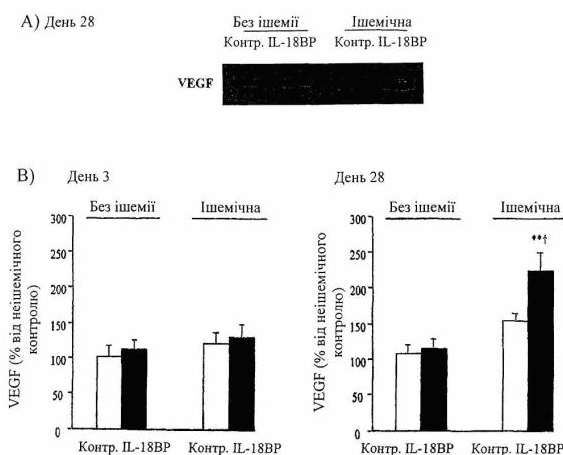
21. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, K (1998). *J. Immunol.* 161, 3400-3407.



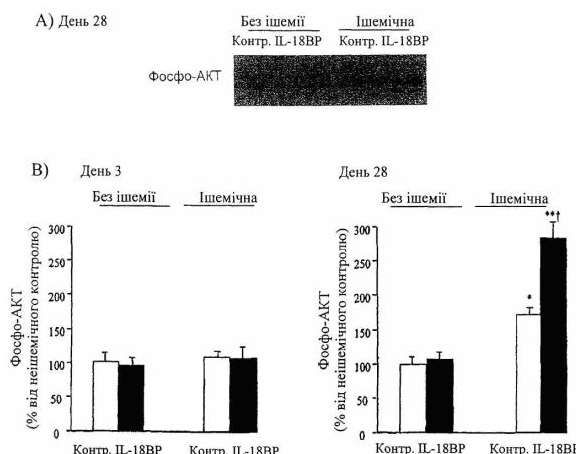
Фіг. 1



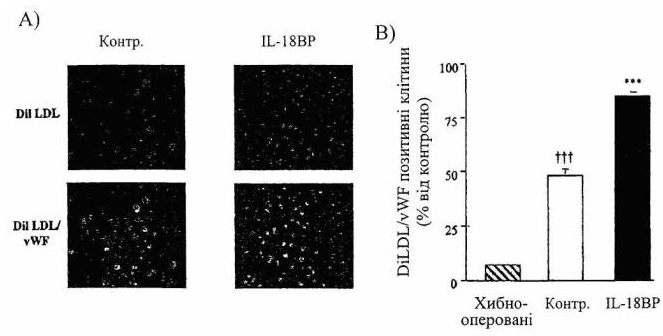
Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5