

Даний винахід відноситься до області захворювань судин. Більш конкретно, винахід відноситься до застосування інгібіторів IL-18 для лікування і/або запобігання атеросклерозу.

Атеросклероз є широко поширеним і найбільш важливим захворюванням судин, але відома множина інших захворювань судин. Атеросклероз в основному вражає великі і середні артерії, і пошкодження включають смужки жиру, фіброзні бляшки і ускладнені ураження. Атеросклероз являє собою хронічне запальне захворювання артеріальної стінки, що характеризується прогресивним накопиченням ліпідів, таких як холестерин, клітин, таких як макрофаги, Т-лімфоцити або гладком'язові клітини, і екстрацелюлярного матриксу [1]. Найбільш великі зкупчення називають атеромами або бляшками, які часто містять кальцій. Жирова тканина може розділити стінку артерії, знижувати еластичність артерії і перешкоджати току крові. У результаті, навколо бляшкоподібних відкладень можуть утворюватися тромби, додатково перешкоджаючи току крові, що може привести до повної оклюзії кровоносної судини. Звичайно атеросклероз пов'язаний з підвищеними рівнями LDL-холестерину, Lp(a) фібриногену і фактора VII, так само як і зі зниженим рівнем HDL-холестерину. Фактори ризику включають більш старший вік, чоловічу стать, куріння, діабет, ожиріння, високий рівень холестерину в крові, діету, багату жирами, і наявність індивідуального або сімейного анамнезу хвороби серця. Він є головною причиною органічної ішемії, такої як, наприклад, інфаркту міокарда.

Атерома є найбільш поширеним пошкодженням артерій, яке далі може ускладнюватись тромбоемболією. Атероматозні бляшки часто звужують просвіт артерій, приводячи до ішемії і іноді до атрофії тканин в області з поганим кровопостачанням. Серйозні наслідки включають симптом стенокардії внаслідок ішемії міокарда, серцеву недостатність внаслідок ішемії або неішемічних причин, і гіпертензію внаслідок звуження ниркової артерії і поганого кровопостачання нирок, яке фізіологічно приводить до збільшення секреції реніну.

Іноді атеросклероз і артеріосклероз відносять до окремих патологічних станів і, в цьому випадку, атеросклероз має на увазі ущільнення (склероз) або втрату еластичності артерій конкретно в результаті атероми, хоча атеросклероз являє собою ущільнення або втрату еластичності артерій внаслідок будь-яких причин.

Ускладнення або наслідки атеросклерозу включають захворювання коронарних артерій (атеросклероз коронарних артерій), недостатність кровопостачання в результаті обструкції (ішемія/стенокардія), гострий ІМ (інфаркт міокарда, серцевий приступ), транзиторну ішемічну атаку (TIA) або інсульт і пошкодження кровоносних судин, м'язової тканини або органів.

Аневризми, які являють собою постійні аномальні розширення кровоносних судин, також є широко поширеними наслідками атеросклерозу. Атеросклеротичні аневризми черевної аорти звичайно розвиваються у немолодих пацієнтів. Вони можуть розриватися в зачеревинний простір. В атеросклеротичних аневризмах звичайно присутні різко виражена втрата еластичної тканини і фіброз середньої оболонки, в основному внаслідок ішемії м'язової тканини середньої оболонки аорти, що супроводжується вивільненням макрофагальних ферментів, що приводить до фрагментації еластичних волокон.

Лікарські засоби, рекомендовані для лікування або запобігання атеросклерозу, направлені на зниження рівня ліпідів/холестерину в крові. Зокрема, широко застосовується терапія, направлена на зниження LDL-холестерину. У цей час найбільш широко застосовуються статини, специфічні інгібітори HMG CoA-редуктази. Інші засоби, що знижують рівень ліпідів, включають такі лікарські засоби, як холестирамін, коlestипол, нікотинава кислота, гемфіброзил, пробукол, ловастатин і інші.

Іншим підходом є мінімізація ризику утворення тромбу на сталому атероматозному пошкодженні. Аспірин, який являє собою специфічний інгібітор тромбосану A2, який опосередковує агрегацію тромбоцитів, або антикоагулянти можуть застосовуватися для зниження ризику утворення тромбу.

У черезшкірній «балонній ангіопластиці» застосовується катетер з балоном на кінці для сплюснення бляшки і збільшення току крові після оклюзії. Технологія подібна технології, що застосовується для відкриття артерій серця, але вона може застосовуватися відносно багатьох інших артерій організму. Стеноз коронарних артерій шунтують за допомогою сегментів підшкірної вени, вшиті в проксимальну частину аорти, або за допомогою відсікання внутрішньої грудної артерії з боку грудної стінки і створення анастомозу її дистального кінця з артерією на передній поверхні серця.

Хірургічне видалення відкладення (ендартеректомія) може бути рекомендоване в деяких випадках (наприклад: ендартеректомія сонної артерії).

Однак основною рекомендацією залишається вплив або контроль над факторами ризику, подібно підтримці дієти з низьким вмістом жиру, низьким вмістом холестерину і низьким вмістом солі і з подальшими направленими на підтримку здорового стану рекомендаціями відносно лікування і контролю за гіпертонією, діабетом і іншими захворюваннями, зниження маси тіла і припинення куріння, так само як і регулярні фізичні вправи для поліпшення стану серця і кровообігу.

Запальний процес присутній на різних стадіях атеросклерозу [1]. Активізація ендотелію за допомогою ряду факторів, що включають невелике дотичне напруження, модифіковані ліпопротеїни і прозапальні цитокіни, вважається першою стадією атеросклерозу і знаходиться під запальним контролем [1]. Багато нещодавніх досліджень показали, що взаємодії між клітинами судини і клітинами запалення є вирішальними в атерогенезі [1]. Зокрема, інгібування окремих прозапальних шляхів уповільнює розвиток атеросклерозу [1].

Запалення також грає головну роль в розпаді атеросклеротичної бляшки і тромбозі [2-5], і тому впливає на появу гострих ішемічних синдромів і пов'язану з ними летальність [6]. Дійсно важкі клінічні вияви атеросклерозу, що включають інфаркти серця, мозку і будь-яких інших органів, ураженого атеросклерозом, в основному є результатом оклюзії просвіту судини тромбом, утвореним при взаємодії із зруйнованою атеросклеротичною бляшкою [3, 4]. Патологічні дослідження показали, що вразливі або нестабільні бляшки, тобто бляшки, схильні до розпаду або які розпадаються, сильно відрізняються за клітинним і матриксним складом в порівнянні зі стабільними бляшками, не схильними до розпаду [7]. Вразливі бляшки багаті клітинами запалення (макрофаги і Т-лімфоцити), містять тромбогенне ліпідне ядро і характеризуються тонким фіброзним верхнім шаром з істотним недоліком позаклітинного матриксу [7].

Зниження синтезу колагену, опосередковане прозапальним цитокіном IFN- γ , і підвищення активності макрофагальних металопротеаз, що руйнують матрикс, є причинами потоншення і крихкості фіброзного верхнього

шару [7]. Руйнування крихкого фіброзного верхнього шару відкриває високо тромбогенне ліпідне ядро для контакту з циркулюючою кров'ю і приводить до утворення оклюзивного тромбу [1, 7]. Тому вважають, що щільність клітин запалення в певному атеросклеротичному пошкодженні є хорошим показником його нестабільності.

Клінічний прогноз для пацієнта з атеросклерозом тільки частково залежить від розміру пошкодження [19, 20]. У цей час широко визнано, що якість (склад бляшки), швидше, ніж розмір пошкодження, може бути навіть кращим показником розвитку ішемічних випадків. Дійсно, важкі клінічні вияви атеросклерозу (інфаркти серця або мозку) в основному є результатом оклюзії просвіту судини тромбом, утвореному на поверхні атеросклеротичної бляшки, що розпадається [19]. Патологічні дослідження показали, що вразливі або нестабільні бляшки, які схильні до розпаду або які розпалися, багаті клітинами запалення і характеризуються істотним недоліком вмісту гладком'язових клітин і колагену [20, 21]. Більш того, в подібних бляшках виявлене збільшення апоптотичної загибелі клітин, що веде до утворення високо тромбогенного ліпідного ядра [13, 22].

Прозапальні цитокіни беруть участь у запаленні. Цитокін інтерлейкін 18 (IL-18) спочатку був описаний як фактор, що індукуює інтерферон- γ (IFN- γ) [8]. Він являє собою ранній сигнал розвитку відповіді лімфоцитів Т-хелперів типу 1 (Th1). IL-18 діє разом з IL-12, IL-2, антигенами, мітогенами і можливо іншими факторами, індукуючи продукцію IFN- γ . IL-18 також посилює продукцію GM-CSF і IL-2, посилює проліферацію Т-клітин, викликає анти-CD3, і підвищує Fas-опосередковану загибель природних кілерів. Зріла форма IL-18 утворюється з його попередника за допомогою IL-1 β -перетворюючого ферменту (ICE, каспаза-1). Рецептор IL-18 складається, принаймні, з двох компонентів, що беруть участь в скріпленні ліганду. Високо- і низькоафінні сайти скріплення IL-18 були знайдені на мишачих Т-клітинах, стимульованих IL-12 [9], передбачаючи існування багатоланцюгового рецепторного комплексу. Дві рецепторні субодиниці ідентифіковані в даний момент, які обидві належать до сімейства рецептора IL-1 [10]. Передача сигналу IL-18 включає активацію NF- κ B [11].

Нещодавно був виділений розчинний білок, що володіє високою афінністю до IL-18, з сечі людини і були клоновані кДНК миші і людини, так само як і ген людини [12; WO 99/09063]. Білок був названий IL-18-зв'язуючий білок (IL-18BP).

IL-18BP не є позаклітинним доменом одного з відомих рецепторів IL-18, а секретованим природно циркулюючим білком. Він належить до нового сімейства секретованих білків, крім того, включає різні білки, що кодуються Rorhirus [12]. IL-18BP постійно експресується в селезінці [12]. Сечовий IL-18BP, так само як і рекомбінантний, специфічно зв'язує IL-18 з високою афінністю і модулює біологічну афінність IL-18.

Ген IL-18BP розташований на хромосомі людини 11q13, і в геномній послідовності розміром 8,3т.п.н. не було знайдено екзону, що кодує трансмембранний домен. Чотири варіанти сплайсингу або ізоформи IL-18BP були знайдені у людини і позначені як IL-18BP a, b, c і d, які всі несуть однакові N-кінцеві послідовності і відмінні C-кінцеві послідовностями [12].

Чотири ізоформи IL-18BP людини і дві мишачі ізоформи, одержані в результаті сплайсингу мРНК і знайдені в різних бібліотеках кДНК, експресували, очищали і оцінювали на скріплення і нейтралізацію біологічної активності IL-18 [23]. Ізоформа IL-18BP людини (IL-18BP α) виявила найбільшу афінність до IL-18 з швидкою активацією (rapid on-rate), повільною інактивацією (slow off-rate) і константою дисоціації (K(d)) 399пМ. IL-18BP α містить Ig-домен IL-18BP α за винятком 29 C-кінцевих амінокислот; K(d) для IL-18BP α в 10 разів менше (2,94нМ). Проте, IL-18BP α і IL-18BP α нейтралізують IL-18 >95% при подвійному мольному надлишку. В ізоформах IL-18BPb і IL-18BPd відсутній повний Ig-домен і відсутня здатність зв'язувати або нейтралізувати IL-18. Мишачі ізоформи IL-18BPc і IL-18BPd, що володіють ідентичним Ig-доменом, також нейтралізують >95% мишачого IL-18 при подвійному мольному надлишку. Однак мишачий IL-18BPd, що містить загальну C-кінцеву послідовність з IL-18BP α людини, також нейтралізує IL-18 людини. Молекулярне моделювання виявило великий змішаний електростатичний і гідрофобний сайт скріплення на Ig-домени IL-18BP, який може бути поясненням його високою афінністю скріплення ліганду [23].

Винахід заснований на даних, що інгібітор IL-18 володіє вираженим благотворним впливом на утворення бляшки, розвиток бляшки і стабільність бляшки на мишачій моделі атеросклерозу. Інгібітор IL-18 не тільки запобігає утворенню ураження грудної аорти, але також і індукуює перемикавання на фенотип стабільної бляшки для атеросклеротичних бляшок, що вже сформувалися.

Тому, винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарських засобів для запобігання і/або лікування атеросклерозу. Винахід, крім того, відноситься до способів лікування з генним терапевтичним підходом лікування і/або запобігання атеросклерозу.

Короткий опис фігур

На Фіг.1 представлена гістограма, що відображає процентне значення виживаності ендотеліальних клітин пупкової вени людини після інкубації тільки з окисленими ліпопротеїнами або інкубації разом з комбінацією окислених ліпопротеїнів з антитілами до IL-18 або IL-18BP відповідно.

На Фіг.2 представлений Вестерн-блот, проведений для білкових екстрактів з атеросклеротичних артерій в порівнянні з контрольними артеріями. У Вестерн-блоті застосовували антитіла проти IL-18BP (hIL-18BP), α -субодиницю рецептора IL-18 (hIL-18BP α), IL-18 (hIL-18) і каспазу-1 (Caspase-1 p10).

На Фіг.3 представлений агарозний гель, забарвлений бромистий етидієм, що показує результат ОТ-ПЛР-аналізу мРНК IL-18 і IL-18BP в клітинах атеросклеротичної бляшки.

На Фіг.4 представлені результати ОТ-ПЛР для IL-18BP і IL-18 в атеросклеротичній бляшці в порівнянні з експресією α -актину (контроль) в симптоматичних і асимптоматичних бляшках.

На Фіг.5 представлена карта експресуваного вектора, використаного для внутрішньом'язового електроперенесення у мишей.

На Фіг.6 представлена гістограма, що відображає площу ліпідних плям в атеросклеротичних артеріях. Кількісний комп'ютерний аналіз зображення ліпідного відкладення. Дані представлені у вигляді середніх величин зі станд. помилкою, (n=19 для вільної плазміди, n=14 для плазміди, що містить IL418BP). Чотирма зірочками відмічене p<0,0001.

На Фіг.7 представлена гістограма, що відображає площу ураження синуса аорти після обробки за допомогою IL-18BP в порівнянні з контролем (вільна плазма). Кількісний комп'ютерний аналіз зображення площі ураження. Дані представлені у вигляді середніх величин зі станд. помилкою, (n=19 для вільної плазми, n=14 для плазми, що містить IL-18BP). Двома зірочками відмічене $p < 0,01$.

На Фіг.8 представлений вплив обробки за допомогою IL-18BP на вміст клітин запалення в області ураження. Кількісний комп'ютерний аналіз зображення застосовували для визначення процентної величини площ, позитивних за вмістом макрофагів (чорні стовпчики) і кількості інфільтруючих Т-лімфоцитів на мм^2 (сірі стовпчики) в зонах уражень синуса аорти контрольних (n=12 для фарбування макрофагів, n=15 для фарбування Т-лімфоцитів) або оброблених за допомогою IL-18BP мишей (n=13 для макрофагів, n=12 для Т-лімфоцитів). Дані представлені у вигляді середніх величин зі станд. помилкою. Трьома зірочками відмічене $p < 0,005$; і чотирма зірочками відмічене $p < 0,0001$.

На Фіг.9 представлений вплив обробки IL-18BP на вміст гладком'язових клітин і колагену в області ураження. Кількісний комп'ютерний аналіз зображення застосовували для визначення процентної величини площ, позитивних за вмістом гладком'язових клітин (чорні стовпчики), і накопичення колагену (сірі стовпчики) в зонах ураження синуса аорти контрольних (n=6 для гладком'язових клітин, n=11 для колагену) або оброблених за допомогою IL-18BP мишей (n=6 для гладком'язових клітин, n=13 для колагену). Дані представлені у вигляді середніх величин зі станд. помилкою. Однією зірочкою відмічене $p < 0,05$; і двома зірочками відмічене $p < 0,01$.

Винахід заснований на даних про підвищені рівні циркулюючого IL-18 у пацієнтів з гострими коронарними синдромами і підвищеною продукцією IL-18 в нестабільних атеросклеротичних бляшках сонної артерії, відповідальних за інсульт. Крім того, показано, що електроперенесення in vivo експресуючої плазмідної ДНК, що кодує IL-18BP, запобігає розвитку жирових смужок в грудній аорті і уповільнює прогресію сформованих атеросклеротичних бляшок в синусі аорти на добре вивченій мишачій моделі атеросклерозу. Більш важливо, перенесення плазми, що містить IL-18BP, індукуює сильні зміни в складі бляшки (зменшення змісту макрофагів, Т-клітин, загибелі клітин і змісту ліпідів і збільшення вмісту гладком'язових клітин і колагену), що приводить до стабільного фенотипу бляшки. Дані результати вперше показують важливу роль інгібіторів IL-18 в зниженні формування бляшки/прогресії і в стимулюванні стабільності бляшки.

Винахід також відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу для лікування і/або запобігання атеросклерозу.

Термін «запобігання» в контексті даному винаходу відноситься не тільки до повного запобігання основному наслідку, але також і до будь-якого часткового або досить істотного запобігання, ослаблення, зменшення, зниження або скорочення наслідку перед або на ранній стадії початку захворювання.

Термін «лікування» в контексті даного винаходу відноситься до будь-якого сприятливого впливу на розвиток захворювання, включаючи ослаблення, зменшення, зниження або скорочення патологічного процесу після початку захворювання.

Термін «інгібітор IL-18» в контексті даного винаходу відноситься до будь-якої молекули, що модулює продукцію і/або функціонування IL-18 таким чином, що продукція і/або функціонування ослабляються, зменшуються або частково, істотно або повністю запобігаються або блокуються.

Інгібітор продукції може являти собою будь-яку молекулу, що негативно впливає на синтез, процесинг або дозрівання IL-18. Інгібітори, що розглядаються згідно з винаходом, можуть бути, наприклад, супресорами експресії гена IL-18, антисмисловими мРНК, що зменшують або що запобігають транскрипції мРНК IL-18 або що приводять до деградації мРНК, білками, що порушують правильне укладання або частково або істотно запобігають дозріванню або секреції IL-18, протеазами, що руйнують IL-18 відразу після його синтезу, і подібними. Інгібітор продукції може являти собою інгібітор каспази-1 або інгібітор ICE, наприклад, який запобігає дозріванню IL-18.

Інгібітор функціонування IL-18 може являти собою, наприклад, антагоніст IL-18. Антагоністи можуть як зв'язувати, так і секвеструвати саму молекулу IL-18 з достатньою афінністю і специфічністю для часткової або істотної нейтралізації IL-18 або сайтів скріплення IL-18, відповідальних за скріплення IL-18 з його лігандами (такими як, наприклад, його рецепторами). Антагоніст також може інгібувати шлях передачі сигналу IL-18, що активується в клітинах при скріпленні IL-18/рецептор.

Інгібітори функціонування IL-18 можуть також являти собою розчинні рецептори IL-18 або молекули, що імітують рецептори, або речовини, що блокують рецептори IL-18, антитіла проти IL-18, такі як, наприклад, моноклональні антитіла, або будь-яку іншу речовину або молекулу, що запобігає скріпленню IL-18 зі своїми мішенями, таким чином ослабляючи або запобігаючи запуску всередині - або позаклітинних реакцій, опосередкованих IL-18.

Атеросклерозом також називають артеріосклероз або ущільнення артерій. Згідно з контекстом даного винаходу термін атеросклероз включає в себе всі захворювання або хворобливі стани артерій, що звичайно описуються як атеросклероз, в ході яких ліпідна речовина відкладається на судинній стінці, в результаті приводячи до звуження і погіршення току крові, так само як і до розриву і/або ерозії з формуванням тромбу.

Згідно з даним винаходом атеросклероз означає як ущільнення, так і втрату еластичності артерій в результаті атероми (атеросклероз) і внаслідок будь-якої іншої причини (артеріосклероз). Патологічні фактори атеросклерозу, так само як і ускладнення або наслідки, які мається на увазі включити в застосовний в описі винаходу термін «атеросклероз», детально описані вище в «рівні техніки».

Прогресування атеросклерозу включає утворення атеросклеротичних бляшок і їх перехід у все більш і більш нестабільні форми. Тому винахід також відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу, що знижує або попереджає прогресування атеросклерозу.

Окклюзія судини тромбом, що сформувався на атеросклеротичній бляшці, є вирішальною подією для інфаркту серця або мозку, які знаходяться в числі найбільш серйозних наслідків атеросклерозу. Тому винахід також відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу для лікування і/або запобігання тромбозу на атеросклеротичній бляшці.

Стабільність бляшки впливає на перетворення атеросклеротичної бляшки в несприятливу або вразливу

бляшку, яка схильна до ініціювання тромбозу. Тому винахід, крім того, відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу для запобігання і/або лікування нестабільності атеросклеротичної бляшки.

Нестабільна бляшка схильна до розпаду, і розпад бляшки може привести до тромбозу. Тому винахід, крім того, відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу для запобігання ерозії або розпаду атеросклеротичної бляшки.

Нестабільність бляшки і тромбоз, наприклад, можуть бути результатом апоптотичної загибелі клітин, яка приводить до високої прокоагулянтної активності і може бути ключовою подією, що приводить до тромбозу ерозованих або бляшок, що розпалися, так само як і до емболічних процесів [13, 14]. Показано, що окислені ліпопротеїни (oxLDL) індукують апоптоз макрофагів і ендотеліальних клітин в культурі [15]. Як показано на прикладах нижче, в цей час встановлено, що інгібітор IL-18 здатний значно знижувати загибель клітин, індуковану oxLDL.

Згідно з даним винаходом несподівано було встановлено, що рівні IL-18 в крові були значно підвищені у пацієнтів з серцевою недостатністю, страждаючих від рецидивних явищ, таких як, наприклад, смерть, рекурентна ішемія, ревааскуляризація, прогресування атеросклерозу або госпіталізація, що періодично повторюється з приводу серцевої недостатності, в порівнянні з пацієнтами, що не потребують повторної госпіталізації. Дане підвищення рівня IL-18 особливо характерне для пацієнтів, які померли через деякий час, в порівнянні з хворими, що вижили. Підвищені рівні IL-18 в крові спостерігалися як у пацієнтів з ішемією, так і у пацієнтів без ішемії.

Тому винахід також відноситься до застосування інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу для лікування і/або запобігання рецидивним випадкам серцевої недостатності. Рецидивні випадки можуть являти собою будь-які випадки серцевої недостатності, такі як смерть, рекурентна ішемія, ревааскуляризація, прогресування атеросклерозу або госпіталізація, що періодично повторюється з приводу серцевої недостатності.

Згідно з переважним втіленням винаходу серцева недостатність є ішемічною, тобто результатом ішемії міокарда.

Згідно з іншим переважним втіленням серцева недостатність є не ішемічною, наприклад, внаслідок системної гіпертензії, пороку клапана серця або захворювання легень, що приводять до правої і потім застійної серцевої недостатності.

Згідно з переважним втіленням винаходу інгібітор IL-18 вибраний з групи, що включає ICE-інгібітори, антитіла проти IL-18, антитіла проти будь-якої з субодиниць рецептора IL-18, інгібітори передачі сигналу від рецептора IL-18, антагоністи IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують рецептор IL-18, і білки, які зв'язують IL-18, ізоформи, мутеїни, гібридні білки, функціональні похідні, активні фракції або їх похідні з круговою перестановкою, що володіють такою ж активністю.

Термін «мутеїни», що застосовується тут, відноситься до аналогів IL-18BP або аналогів вірусного IL-18BP, в якому один або декілька амінокислотних залишків нативного IL-18BP або вірусна IL-18BP заміщені різними амінокислотними залишками або відсутні, або один або декілька амінокислотних залишків додані до нативної послідовності IL-18BP або вірусного IL-18BP без значної зміни активності одержаних продуктів в порівнянні з вихідним типом IL-18BP або вірусним IL-18BP. Дані мутеїни одержують за допомогою відомих способів синтезу і/або сайт-специфічного мутагенезу або будь-яких відомих способів, придатних для застосування в даному винаході.

Будь-який подібний мутеїн переважно має амінокислотну послідовність, що достатньо повторює послідовність IL-18BP або достатньо повторює вірусну IL-18BP, такий, щоб володіти значною мірою схожою активністю з IL-18BP. Одним виявом активності IL-18BP є його здатність скріплення IL-18. Наскільки мутеїн володіє достатньою зв'язуючою активністю по відношенню до IL-18BP, настільки він може застосовуватися для очищення IL-18, наприклад, за допомогою афінної хроматографії, і, таким чином, можна вважати володіє досить схожою активністю з IL-18BP. Таким чином, можна визначити у будь-якого даного мутеїну наявність досить схожої активності з IL-18BP за допомогою звичайного експериментування, піддаючи подібний мутеїн, наприклад, простому конкурентному сендвіч-аналізу для встановлення здатності скріплення відповідним чином міченого IL-18, наприклад, радіоімунаналізу або аналізу ELISA.

Мутеїнові поліпептиди IL-18BP або мутеїни вірусних IL-18BP, які можуть застосовуватися згідно з даним винаходом, або кодуєча їх нуклеїнова кислота включають обмежений набір значно співпадаючих послідовностей як заміщуючих пептидів або полінуклеотидів, які можуть бути просто одержані фахівцем в даній області без великої кількості експериментів, заснованих на принципах і керівництві, представлених в описі винаходу.

Переважні модифікації мутеїнів згідно з даним винаходом являють собою заміни, відомі як «консервативні». Консервативні амінокислотні замісники поліпептидів IL-18BP або білків або вірусних IL-18BP можуть включати синонімічні амінокислоти в межах групи, що володіє досить схожими фізико-хімічними властивостями, так що при заміщенні одного члена групи іншим буде зберігатися біологічна функція молекули [16]. Зрозуміло, що також можна здійснити вставки і делеції амінокислот у вищезгаданих послідовностях без зміни їх функції, особливо якщо вставки або делеції містять тільки невелику кількість амінокислот, наприклад, менше тридцяти і переважно менше десяти, і без видалення або переміщення амінокислот, що є вирішальними у функціональній структурі, наприклад, залишків цистеїну. Білки і мутеїни, одержані за допомогою подібних делецій і/або вставок, входять в об'єм даного винаходу.

Переважно синонімічні амінокислотні групи являють собою вказані в Таблиці I. Більш переважно синонімічні амінокислотні групи вказані в Таблиці II; і найбільш переважні синонімічні амінокислотні групи вказані в Таблиці III.

Таблиця I

Переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	He, 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 II

Більш переважні
групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
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 III

Найбільш переважні
групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Trn
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 проведення заміщень амінокислот в білках, які можуть застосовуватися для одержання мутеїнових поліпептидів або білків IL-18BP, або мутеїнових вірусних IL-18BP для застосування згідно з даним винаходом, включають будь-які відомі стадії способів, таких як представлені в [патентах США 4959314, 4588585 і 4737462 Mark et al.; 5116943 Koths et al.; 4965195 Namen et al.; 4879111 Chong et al.; і 5017691 Lee et al.]; і білки, заміщені за лізином, представлені в [патенті США №4904584 (Shaw et al)].

Термін «гібридний білок» відноситься до поліпептиду, що містить IL-18BP або вірусний IL-18BP, або їх мутеїн, злиті з іншим білком, який, наприклад, володіє тривалим періодом перебування в рідких середовищах організму. IL-18BP і вірусний IL-18BP може подібним чином бути приєднаний до іншого білка, поліпептиду або подібного, наприклад, імуноглобуліну або його фрагменту.

Термін «функціональні похідні», що застосовується, включає похідні IL-18BP або вірусного IL-18BP і їх мутеїнів і гібридних білків, які можуть бути одержані з функціональних груп, які розташовуються у вигляді бічних ланцюгів на залишках або N-, або C-кінцевих груп, за допомогою відомих в даній області способів, і включені у винахід, поки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не порушують активності білка, яка досить схожа з активністю IL-18BP або вірусними IL-18BP, і не додають токсичних властивостей утримуючої їх композиції. Дані похідні можуть, наприклад, включати поліетиленглікольні бічні ланцюги, які можуть маскувати антигенні сайти і збільшувати перебування IL-18BP або вірусну IL-18BP в рідких середовищах організму. Інші похідні включають аліфатичні складні ефіри карбоксильних груп, аміди карбоксильних груп, одержані взаємодією аміаку з первинними або вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, одержані за допомогою ацильних груп (наприклад, алканойл або карбоциклічні ароїльні групи), або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, гідроксильні групи залишків серину або треонілу), одержані за допомогою ацильних груп.

Під терміном «активні фракції» IL-18BP або вірусного IL-18BP, мутеїнів і гібридних білків даний винахід має на увазі будь-який фрагмент або попередники поліпептидного ланцюга білкової молекули окремо або разом з пов'язаними молекулами або залишками, приєднаними до них, наприклад, залишками цукрів або фосфатними залишками, або агрегатами самої білкової молекули або залишків цукрів, забезпечуючи щоб вказана фракція володіла досить схожою активністю з IL-18BP.

Згідно з іншим переважним втіленням винаходу інгібітор IL-18 являє собою антитіло проти IL-18. Антитіла проти IL-18 можуть бути поліклональними або моноклональними, химерними, гуманізованими або навіть повністю людськими. Рекомбінантні антитіла або їх фрагменти характеризуються високою афінністю скріплення з IL-18 in vivo і низькою токсичністю. Антитіла, які можуть застосовуватися згідно з винаходом, характеризуються за їх здатністю лікування пацієнтів протягом періоду, достатнього для досягнення від хорошої до чудової міри регресії або ослаблення патогенного стану або будь-якого симптому або групи симптомів, пов'язаної з патогенним станом, і низькою токсичністю.

Нейтралізуючі антитіла легко одержують від тварин, таких як кролики, коза або миші, шляхом імунізації за допомогою IL-18. Імунізовані миші є особливо придатними для забезпечення джерел В-клітин для одержання гібридом, які по черзі культивують для одержання великих кількостей моноклональних антитіл проти IL-18.

Химерні антитіла являють собою молекули імуноглобуліну, що характеризуються двома або декількома сегментами або частинами, одержаними від різних видів тварин. Звичайно варіабельну область химерного антитіла одержують з антитіла ссавця, не людини, такого як миша, а моноклональне антитіло, і константну область імуноглобуліну одержують з молекули імуноглобуліну людини. Переважно обидві області і комбінація володіють низькою імуногенністю, що визначається звичайним чином [24]. Гуманізовані антитіла являють собою молекули імуноглобуліну, створені за допомогою генно-інженерних технологій, в яких константна область миші заміщена еквівалентною областю людини, при цьому зберігаючи антиген-зв'язуючі регіони миші. Одержане химерне антитіло миша-людина переважно володіє зниженою імуногенністю і поліпшеними фармакокінетичними властивостями у людини [25].

Таким чином, згідно з іншим переважним втіленням антитіло проти IL-18 являє собою гуманізоване антитіло проти IL-18. Переважні приклади гуманізованих антитіл проти IL-18 описані, наприклад, в [заявці на видачу Європейського патенту EP 0974600].

Згідно з ще іншим переважним втіленням антитіло проти IL-18 є повністю людським. Технологія одержання антитіл людини описана детально, наприклад, в [WO 00/76310, WO 99/53049, US 6162963 або AU 5336100]. Повністю людські антитіла є переважно рекомбінантними антитілами, продукованими трансгенними тваринами, наприклад, химерними мишами, що містять повністю або частини функціональних локусів Ig людини.

Згідно з дуже переважним втіленням даного винаходу інгібітор IL-18 являє собою IL-18BP або його ізоформу, мутеїн, гібридний білок, функціональне похідне, активну фракцію або похідне з круговою перестановкою. Дані ізоформи, мутеїни, гібридні білки або функціональні похідні зберігають біологічну активність IL-18BP, особливо скріплення з IL-18, і переважно володіють, принаймні, істотною активністю, схожою з IL-18BP. Ідеально, подібні білки володіють біологічною активністю, яка навіть підвищена в порівнянні з незміненим IL-18BP. Переважні активні фракції володіють активністю, більш високою, ніж активність IL-18BP, або що має додаткові переваги, подібні більш високій стабільності або більш низькій токсичності або імуногенності, або їх легше одержати у великій кількості або легше очистити.

Послідовності IL-18BP і його варіантів/ізоформ сплайсингу можуть бути взяті з [WO 99/09063] або з [12] так само як і з [23].

Функціональні похідні IL-18BP можуть бути приєднані до полімерів для поліпшення властивостей білка, та-

ких як стабільність, півперіод існування, біодоступність, толерантність відносно організму людини або імуногенність. Для виконання даної мети IL-18BP може бути приєднаний, наприклад, до поліетиленгліколю (PEG). Приєднання PEG може проводитись за допомогою відомих способів, описаних, наприклад, в [WO 92/13095].

Тому, згідно з переважним втіленням даного винаходу, IL-18BP приєднаний до PEG.

Згідно з іншим переважним втіленням винаходу інгібітор IL-18 являє собою гібридний білок, що містить цілком IL-18-зв'язуючий білок або його частину, яка приєднана до цілого імуноглобуліну або його частини. Фахівцві в даній області буде зрозуміло, що одержаний гібридний білок зберігає біологічну активність IL-18BP, зокрема, скріплення з IL-18. Злиття може бути прямим або за допомогою короткого лінкерного білка, який може бути коротким довжиною від 1 до 3 амінокислотних залишків або довше, наприклад, довжиною 13 амінокислотних залишків. Вказаний лінкер може бути трипептидом з послідовністю, наприклад, E-F-M (Glu-Phe-Met), або з лінкерною послідовністю в 13 амінокислот, що включає Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln, вбудованою між послідовністю IL-18BP і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний гібридний білок володіє поліпшеними властивостями, такими як збільшений період перебування в рідких середовищах організму (півперіод існування), підвищена специфічна активність, підвищений рівень експресії або полегшення очищення гібридного білка.

Згідно з переважним втіленням IL-18BP приєднують до константної області молекули Ig. Переважно, проводять приєднання до області важких ланцюгів, наприклад, подібно CH₂ і CH₃-доменам IgG1 людини. Одержання специфічних гібридних білків, що містять IL-18BP і частину імуноглобуліну, наприклад, описані в [прикладі 11 WP 99/09063]. Інші ізоформи молекули Ig також придатні для одержання гібридних білків згідно з даним винаходом, такі як ізоформи IgG₂ або IgG₄, або інші класи Ig, наприклад, подібно IgM або IgA. Гібридні білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними.

Інтерферони переважно відомі за ефектами інгібування вірусної реплікації і клітинної проліферації. Інтерферон-γ, наприклад, відіграє важливу роль у розвитку імунної і запальної відповідей. Вказують, що інтерферон-γ (IFN-γ, інтерферон типу I) відіграє протизапальну роль.

Винахід також відноситься до застосування комбінації інгібітору IL-18 і інтерферону для одержання лікарського засобу для лікування атеросклерозу.

Інтерферони також можуть бути приєднані до полімерів для поліпшення стабільності білків. Кон'югат інтерферону β і поліолу поліетиленгліколю (PEG), наприклад, описаний в [WO 99/55377].

Згідно з іншим переважним втіленням винаходу інтерферон являє собою інтерферон-β (IFN-β) і більш переважно IFN-B 1a.

Інгібітор продукції і/або функції IL-18 переважно застосовують одночасно, послідовно або окремо з інтерфероном.

Згідно з ще іншим втіленням винаходу інгібітор IL-18 застосовують в поєднанні з антагоністом TNF. Антагоністи TNF виявляють свою активність різними шляхами. Перший, антагоністи можуть зв'язувати або секвестувати саму молекулу TNF з достатньою афінністю і специфічністю для часткової або значної нейтралізації епітопу TNF або епітопів, відповідальних за скріплення з рецептором TNF (тут і далі названі «секвестуючі антагоністи»). Секвестуючі антагоністи можуть, наприклад, бути антитілом проти TNF.

Альтернативно, антагоністи TNF можуть інгібувати шлях передачі сигналу TNF, що активується за допомогою рецептора на поверхні клітини після скріплення TNF (тут і далі названі «сигнальні антагоністи»). Обидві групи антагоністів є прийнятними як окремо, так і разом, в поєднанні з інгібітором IL-18 при лікуванні атеросклерозу.

Антагоністи TNF легко розпізнаються і оцінюються за допомогою звичайного відбору кандидатів за їх впливом на активність нативного TNF на чутливих клітинних лініях *in vitro*, наприклад, В-клітинах людини, в яких TNF викликає проліферацію і секрецію імуноглобулінів. Аналіз включає склад TNF при різному розведенні кандидата-антагоніста, наприклад, від 0,1 до 100-кратної мольної кількості TNF, що застосовується для аналізу, і контролю з відсутністю TNF або тільки антагоністом [26].

Секвестуючими антагоністами є переважні антагоністи TNF, що застосовуються згідно з даним винаходом. Серед секвестуючих антагоністів переважними є такі поліпептиди, які зв'язують TNF з високою афінністю і володіють низькою імуногенністю. Розчинні молекули рецептора TNF і нейтралізуючі антитіла проти TNF є особливо переважними. Наприклад, розчинний TNF-RI і TNF-RII є придатними згідно з даним винаходом. Усічені форми даних рецепторів, що включають позаклітинні домени рецепторів або їх функціональні частини, являють собою особливо переважні антагоністи згідно з даним винаходом. Усічені розчинні рецептори TNF типу I і TNF типу II, наприклад, описані в [EP914431].

Усічені форми рецепторів TNF розчинні і визначаються в сечі і сироватці як 30кДа і 40кДа інгібіторні білки, що зв'язують TNF, які позначаються TBPI і TBPII відповідно [27]. Згідно з винаходом переважне одночасне, послідовне або окреме застосування інгібітору IL-18 з антагоністом TNF і/або інтерфероном.

Згідно з винаходом TBPI і TBPII є переважними антагоністами TNF, що застосовуються в поєднанні з інгібітором IL-18. Похідні, фрагменти, області і біологічно активні ділянки молекули рецепторів функціонально мають схожість з молекулами рецепторів і також можуть застосовуватися в даному винаході. Подібний біологічно активний еквівалент або похідне молекули рецептора відноситься до ділянки поліпептиду або послідовності, що кодує молекулу рецептора, який має істотний розмір і здатний зв'язувати TNF з такою афінністю, що взаємодіє з мембранозв'язаним рецептором TNF інгібується або блокується.

Згідно з додатковим переважним втіленням розчинний TNF-RI (TBPI) людини являє собою антагоніст TNF, що застосовується згідно з винаходом. Нативні і рекомбінантні молекули розчинного рецептора TNF і способи їх одержання описані в [Європейських патентах EP 308378, EP 398327 і EP 433900].

Інгібітор IL-18 може застосовуватися одночасно, послідовно або окремо від інгібітору TNF. Переважно застосовується комбінація антитіла проти IL-18 або антисироватка і розчинний рецептор TNF, що володіє інгібуючою активністю по відношенню до TNF.

Згідно з іншим переважним втіленням винаходу лікарський засіб додатково включає інгібітор COX, переважне інгібітор COX-2. Інгібітори COX відомі в даній області. Конкретні інгібітори COX-2 описані, наприклад, в

[WO 01/00229].

Інгібітори тромбосану, зокрема тромбосану A2, в цей час широко застосовуються для лікування атеросклерозу. Отже, згідно з іншим переважним втіленням винаходу лікарський засіб додатково включає інгібітор тромбосану, і зокрема, інгібітор тромбосану A2, для одночасного, послідовного або окремого застосування. Згідно з винаходом особливо переважним є застосування аспірину в поєднанні з інгібітором IL-18.

Однією з причин атеросклерозу стає наявність високої концентрації ліпідів в крові. Отже, згідно з іншим переважним втіленням лікарський засіб додатково включає агент, що знижує рівень ліпідів, для одночасного, послідовного або окремого застосування. Будь-який агент, що знижує рівень ліпідів, відомий в даній області, може застосовуватися згідно з винаходом, такий як наступні агенти, що знижують рівень ліпідів, що включають лікарські засоби, такі як холестирамін, коlestипол, нікотинова кислота, гемфіброзил, пробукол та інші. Особливо переважними є інгібітори HMG CoA-редуктази і переважно так звані статини. Багато які статини є відомими в даній області, такі як симвастатин або ловастатин.

Для поліпшення запобігання і/або лікування атеросклерозу переважне втілення винаходу відноситься до застосування інгібітору IL-18 в поєднанні з дієтою з низьким вмістом жиру і/або холестерину і/або солі.

Згідно з переважним втіленням даного винаходу інгібітор IL-18 застосовують в дозі приблизно від 0,0001 до 10мг/кг маси тіла або приблизно від 0,01 до 5мг/кг маси тіла, або приблизно від 0,1 до 3мг/кг маси тіла, або приблизно від 1 до 2мг/кг маси тіла. Згідно з ще одним переважним втіленням інгібітор IL-18 застосовують в дозі приблизно від 0,1 до 1000мг/кг маси тіла або від 1 до 100мг/кг маси тіла, або від 10 до 50мг/кг маси тіла.

Винахід, крім того, відноситься до застосування експресуючого вектора, що містить послідовність, яка кодує інгібітор IL-18, для одержання лікарського засобу для запобігання і/або лікуванню атеросклерозу. Таким чином, для лікування і/або запобігання захворюванню застосовуються підходи генної терапії. Переважно, експресія інгібітору IL-18 далі буде проходити *in situ*, таким чином ефективно блокуючи IL-18 безпосередньо в тканині(ах) або клітинах, схильних до цього захворювання.

Як детально викладено в прикладах нижче, показано, що ефективна експресія IL-18BP може бути представлена на мишачій моделі захворювання після електроперенесення експресуючого вектора, що містить послідовність, що кодує IL-18BP.

Отже, згідно з переважним втіленням експресуючий вектор вводять за допомогою електроперенесення, переважно внутрішньом'язово.

Застосування вектора для індукції і/або посилення ендогенної продукції інгібітору IL-18 в клітині, яка звичайно не експресує інгібітор IL-18 або в якій кількість експресованого інгібітору не суттєва, також розглядається згідно з винаходом. Вектор може містити регуляторні послідовності, що функціонують в клітинах, в яких бажана експресія інгібітору IL-18. Подібні регуляторні послідовності можуть, наприклад, містити промотори або енхансери. Регуляторна послідовність далі може бути вбудована в правильний локус генома шляхом гомологічної рекомбінації, таким чином реально зв'язуючи регуляторну послідовність з геном, експресію якого необхідно індукувати або посилити. Технологію звичайно відносять до «ендогенної активації гена» (EGA), і вона описана, наприклад, в [WO 91/09955].

Фахівцям в даній області буде зрозуміло, що також можливо припинити експресію IL-18, застосовуючи такі ж способи, тобто за допомогою вбудовування негативно регулюючого елемента, наприклад, сайленсера, в локус гена IL-18, таким чином, приводячи до негативної регуляції або припинення експресії IL-18. Фахівцям в даній області буде зрозуміло, що подібна негативна регуляція або придушення експресії IL-18 має такий же ефект, що і застосування інгібітору IL-18 для запобігання і/або лікування захворювання.

Винахід, крім того, відноситься до застосування клітини, генетично модифікованої, для продукції інгібітору IL-18 для одержання лікарського засобу для лікування і/або запобігання атеросклерозу.

Винахід, крім того, відноситься до фармацевтичних композицій, особливо придатних для запобігання і/або лікування атеросклерозу, які включають терапевтично ефективну кількість інгібітору IL-18 і терапевтично ефективну кількість інтерферону. Як інгібітор IL-18 композиція може включати інгібітори каспази-1, антитіла проти IL-18, антитіла проти будь-якої з субодиниць рецептора IL-18, інгібітори шляху передачі сигналу IL-18, антагоністи IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують рецептор IL-18, і білки, що зв'язують IL-18, їх ізоформи, мутеїни, гібридні білки, функціональні похідні, активні фракції або похідні з круговою перестановкою, що володіють такою ж активністю.

IL-18BP і їх ізоформи, мутеїни, гібридні білки, функціональні похідні, активні фракції і похідні з круговою перестановкою, описані вище, є переважними активними складовими фармацевтичних композицій.

Інтерферон, що входить в фармацевтичну композицію, переважно являє собою IFN- β .

Згідно з ще іншим переважним втіленням фармацевтична композиція включає терапевтично ефективну кількість інгібітору IL-18, необов'язково інтерферон і антагоніст TNF. Антагоністи TNF можуть бути антитілами, нейтралізуючими активність TNF або розчинними усіченими фрагментами рецептора TNF, що також позначаються TPBI і TPBII. Фармацевтична композиція згідно з винаходом може додатково містити один або декілька інгібіторів COX, переважно інгібітори COX-2. Фармацевтична композиція згідно з винаходом може додатково містити інгібітор тромбосану, такий як аспірин, і/або речовина, що знижує рівень ліпідів, така як статин.

Визначення «фармацевтично прийнятний» означає включення будь-якого носія, який не перешкоджає ефективності біологічної активності активного компонента, і не є токсичним по відношенню до хазяїна, якому він вводиться. Наприклад, для парентерального введення активні білки можуть бути сформовані в стандартну дозовану форму для ін'єкцій разом з носіями, такими як сольовий розчин, розчин декстрази, сироватковий альбумін і розчин Рінгера.

Активні компоненти фармацевтичної композиції згідно з винаходом можуть вводитися індивідуально різними шляхами. Шляхи введення включають внутрішньошкірний, черезшкірний (наприклад, при складах, що повільно вивільняються), внутрішньом'язовий, внутрішньочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, епідуральний, місцевий і інтраназальний шлях. Може застосовуватися будь-який інший терапевтично ефективний шлях введення, наприклад, абсорбція через епітеліальні або ендотеліальні тканини, або шляхом

генної терапії, при якому молекула ДНК, що кодує активний компонент, вводиться пацієнту (наприклад, за допомогою вектора), що приводить до експресії активного компонента і секреції *in vivo*. Крім того, білок (білки) згідно з винаходом можуть вводитися разом з іншими компонентами біологічно активних препаратів, такими як фармацевтично прийнятні сурфактанти, ексципієнти, наповнювачі, розріджувачі і носії.

Для парентерального введення (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) активний білок (білки) може бути представлений у формі розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку в поєднанні з фармацевтично прийнятним парентеральним носієм (наприклад, водою, сольовим розчином, розчином декстрози) і добавками, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стабільність (наприклад, консерванти або буфери). Форму стерилізують за допомогою способів, що звичайно застосовуються.

Біодоступність активного білка (білків) згідно з винаходом також можна поліпшити за допомогою способів приєднання, які збільшують півперіод існування молекули в організмі людини, наприклад, приєднанням молекули до поліетиленгліколю, як описано в [РСТ-заявці на видачу патенту WO 92/13095].

Терапевтично ефективна кількість активного білка (білків) може бути функцією багатьох змінних, включаючи тип антагоніста, афінність антагоніста до IL-18, яка-небудь залишкова цитотоксична активність, що виявляється антагоністом, шлях введення, клінічний стан пацієнта (включаючи бажаність підтримки нетоксичного рівня активності ендogenous IL-18).

«Терапевтично ефективна кількість» є такою, що при введенні інгібітору IL-18 спостерігається інгібування біологічної активності IL-18. Доза, що вводиться у вигляді однієї або багаторазової дози пацієнту, буде змінюватися в залежності від ряду факторів, що включають фармакокінетичні властивості інгібітору IL-18, шлях введення, стан пацієнта і характеристики (стать, вік, маса тіла, стан здоров'я, розмір), наявність симптомів, супутня терапія, частота лікування і бажаний ефект. Підбір і маніпулювання встановленими межами дозування входить в компетенцію фахівця в даній області, так само як і способами визначення *in vitro* і *in vivo* інгібування IL-18 у пацієнта.

Згідно з винаходом інгібітор IL-18 застосовують в кількості приблизно від 0,0001 до 10мг/кг або приблизно від 0,01 до 5мг/кг маси тіла, або приблизно від 0,1 до 3мг/кг маси тіла, або приблизно від 1 до 2мг/кг маси тіла. Інша переважна кількість інгібіторів IL-18 складає приблизно від 0,1 до 1000мкг/кг маси тіла або приблизно від 1 до 100мкг/кг маси тіла, або від 10 до 50мкг/кг маси тіла.

Шлях введення, що є переважним згідно з винаходом, являє собою введення підшкірним шляхом. Внутрішньом'язове введення є іншим переважним шляхом згідно з винаходом.

Згідно з іншими переважними втіленнями інгібітор IL-18 вводиться щодня або через день.

Добові дози звичайно даються в розділених дозах або в формі з уповільненим вивільненням для досягнення бажаних результатів. Другі або подальші введення можуть проводитись в такій же дозованій формі в меншій або більшій дозі в порівнянні з початковою або попередньою дозою, що вводиться пацієнту. Друге або подальше введення може проводитись в ході або перед початком захворювання.

Згідно з винаходом інгібітор IL-18 може вводиться профілактично або терапевтично пацієнту перед, одночасно або послідовно з іншими терапевтичними схемами або препаратами (наприклад, схема, що включає декілька ліків) в терапевтично ефективній кількості. Активні речовини, що вводяться одночасно з іншими терапевтичними препаратами, можуть вводитися в одній або різних композиціях.

Винахід, крім того, відноситься до способу лікування і/або запобігання атеросклерозу, що включає введення потребуючому цього хазяїну ефективної інгібуючої кількості інгібітору IL-18.

Винахід, крім того, відноситься до способу запобігання і/або лікування атеросклерозу, що включає введення потребуючому цього хазяїну експресуючого вектора, що містить послідовність, що кодує інгібітор IL-18.

Згідно з переважним втіленням винаходу експресуючий вектор вводять системно і більш переважно за допомогою внутрішньом'язових ін'єкцій.

Винахід, крім того, відноситься до застосування IL-18 як діагностичного маркера поганого клінічного прогнозу серцевої недостатності. Поганий клінічний прогноз включає будь-яке погіршення стану пацієнта, подібно рецидивним явищам або навіть смерті, що слідує за першим інфарктом міокарда.

Переважно IL-18 застосовують як діагностичний маркер рецидивних випадків після першого вияву серцевої недостатності. Рецидивні випадки включають, але не обмежуються, смерть, рекурентну ішемію, ревазуляризацію, прогресію атеросклерозу або госпіталізацію, що періодично повторюється з приводу серцевої недостатності.

Щойно описаний винахід буде більш легко зрозуміло за допомогою посилання на подальші приклади, які представлені для ілюстрації і не призначені для обмеження даного винаходу.

Приклади

Матеріали і методи

Зразки

Збирали сорок одну атеросклеротичну бляшку людини, видалені у 36 пацієнтів, що зазнали ендартеректомії сонної артерії. Для контролю 2 сонні артерії і 3 внутрішні грудні артерії, не уражені атеросклерозом (2 з мінімальними фібром'язовими ущільненнями), одержували шляхом аутопсії або в ході операції коронарного шунтування. Їх швидко занурювали в рідкий азот і зберігали при -80°C. Бляшки, які застосовували для екстракції білка і РНК, швидко промивали, занурювали в рідкий азот перед приміщенням на зберігання при -80°C. Для імуногістохімічних досліджень бляшки вміщували на 2 години в свіжоприготований 4% параформальдегід, далі переносили в 30% розчин сахароза - PBS перед швидким заморожуванням в оптимальному середовищі обробки тканини до температури різання (O.C.T. Compound, Miles Inc, Diagnostics Division) за допомогою рідкого азоту і зберігали при -80°C для криостатного секціонування. Декілька зрізів від 8 до 10мкм одержували з кожного зразка для гістологічного аналізу і імуногістохімічного дослідження.

Класифікація пацієнтів

Для вивчення можливого зв'язку між експресією IL-18/IL-18BP і ознаками нестабільності бляшки автори збирали клінічні дані *in prospective* і сліпим способом у 23 наступних один за одним пацієнтів (з 36), що зазнали процедури ендартеректомії між квітнем і травнем 2000. Наявність або відсутність покриття виразками все-

редині бляшки при макроскопічному дослідженні систематично відмічалася хірургом, що проводив процедуру ендартеректомії. Це давало можливість авторам класифікувати бляшки як покриті або непокриті виразками бляшки. Крім того, пацієнтів систематизували згідно з клінічними симптомами на дві окремі групи. Пацієнтів, у яких були присутніми клінічні симптоми ішемічного порушення мозкового кровообігу, що відносяться до стенозу сонної артерії, класифікували як симптоматичних. Ендартеректомію проводили через 2-66 днів ($17,6 \pm 5,3$ днів) після появи клінічних симптомів у даних пацієнтів. Пацієнтів, які ніколи не відчували симптоми ішемічного порушення мозкового кровообігу в області сонної артерії, класифікували як асимптоматичних. Асимптоматичний стеноз сонної артерії визначали на основі систематичної клінічної оцінки пацієнтів із захворюванням серця або периферичних судин, і його важкість встановлювали за допомогою повторної Допплер-ехографії дійсно досвідченим ехографістом. Навіть якщо асимптоматичні пацієнти ніколи не мали ішемічного епізоду в області стенозу сонної артерії, ендартеректомія сонної артерії була показана корисною даним пацієнтам, як показано дослідниками асимптоматичного атеросклерозу сонної артерії (ACAS) [28].

Вестерн-блот-аналіз

Білки екстрагували з 12 атеросклеротичних бляшок і 5 контрольних нормальних артерій. Заморожені зразки розтирали в присутності рідкого азоту. Порошкоподібну масу ресуспендували в крижаному лізуючому буфері [20ммоль/л Трис-HCl, pH 7,5, 5ммоль/л EGTA, 150ммоль/л NaCl, 20ммоль/л гліцерофосфату, 10ммоль/л NaF, 1ммоль/л ортованадату натрію, 1% Тритон X-100, 0,1% Tween 20, 1мкг/мл аprotиніну, 1ммоль/л PMSF, 0,5ммоль/л N-тозил-L-фенілаланінхлорметилкетону (TPCK), 0,5ммоль/л N(a)-п-тозил-L-лізинхлорметилкетону (TLCK)] у співвідношенні 0,3мл/10мг за масою. Екстракти інкубували на льоду протягом 15 хвилин і далі центрифугували (12000g, 15 хвилин, 4°C). Детергент-розчинні супернатанти фракції зберігали, і концентрації білка в зразках визначали за допомогою білкового аналізу Bio-Rad.

Для проведення Вестерн-блотингу для IL-18 і IL-18R білкові екстракти кип'ятили протягом 5 хвилин і наносили на 7,5% або 15% SDS-поліакриламідний гель. Для IL-18BP rhlL-18, виділений з E. Coli (Serono Pharmaceutical Research Institute, Geneva) з'єднували з Affigel 15 (Biorad) на 1мг/мл смоли згідно з протоколом виробників. Білковий екстракт (60мкг) інкубували протягом ночі при 4°C з мішалкою разом з 20мкл смоли, доведеної до 500мкл PBS 0,05% Tween. Для видалення будь-якого неспецифічного скріплення смоли центрифугували і промивали 10мМ Tris pH 8, 140мМ NaCl, 0,5% Тритон-X=100 (Fluka), 0,5% дезоксихлоратом, потім 50мМ Tris pH 8, 200мМ NaCl, 0,05% TX100, 0,05% nonidet P40 (Fluka), 2мМ CHAPS (Boehringer, Mannheim), з подальшим останнім промиванням 50мМ Tris pH 8. Далі смоли центрифугували, ресуспендували в буфері для зразків в приведених умовах, кип'ятили протягом 5 хвилин і, нарешті, наносили на 10% SDS-поліакриламідний гель Nu-PAGE (Invitrogen).

Зразки електрофоретично переносили з поліакриламідних гелів на нітроцелюлозу. Нітроцелюлозні мембрани просочували протягом 2 годин при кімнатній температурі в TBST [50ммоль/л трис-HCl (pH 7,5), 250ммоль/л NaCl і 0,1% сольовий розчин Tween], що містить 5% безліпідного сухого молока. Далі мембрани інкубували з козячими поліклональними антитілами проти IL-18 і IL-18R (α -ланцюг) людини (1мкг/мл) (R&D Systems), мишачими моноклональними антитілами проти IL-18BP людини (Mab 657,27 5мкг/мл) [Corbaz et al., 2000, рукопис друкується], кролячими поліклональними антитілами проти каспази-1 людини (1мкг/мл) (A-19, Santa Cruz). Специфічність Mab 657,27 аналізували на смужці мембрани шляхом конкурентного аналізу за допомогою 200-молярного надлишку rhlL-18PB-6his (виділеного з клітин яєчника китайського хом'ячка, Serono Pharmaceutical Research Institute), спільно інкубованого з Mab 657,27 в концентрації 5мкг/мл протягом 1 години. Подальшу інкубацію з HRP, пов'язаним з відповідними антитілами, хемілюмінесцентними речовинами (ECL, Western blotting; Amersham Corp) проводили для виявлення позитивних смуг згідно з інструкціями виробників, і смуги візуалізували після експозиції з фотоплівкою Hyperfilm ECL (Amersham Corp).

Імуногістохімія

Заморожені зрізи 6 атеросклеротичних бляшок інкубували з нормальною кінською сироваткою 1:10 або нормальною козячою сироваткою 1:10 протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, однократно промивали PBS, далі інкубували або з першими мишачими моноклональними антитілами проти CD68 для розпізнавання макрофагів (DAKO-CD68, KP1), або з першими мишачими моноклональними антитілами проти α -актину гладком'язової тканини людини (1A4, DAKO) для розпізнавання гладком'язових клітин. Для розпізнавання IL-18 і рецептора IL-18 в атеросклеротичних бляшках застосовували специфічні козячі поліклональні антитіла (R&D Systems) в розведенні 5мкг/мл. IL-18BP визначали за допомогою специфічних моноклональних антитіл проти рекомбінантної ізоформи IL-1SBP людини (H₂O) [Corbaz et al., 2000, рукопис друкується]. Після промивання в PBS скло інкубують з наступними другими пов'язаними з біотином антитілами: пов'язані з біотином кінські IgG проти імуноглобуліну миші [Vector Laboratories, Inc] в розведенні 1:200 для визначення місць приєднань антитіл проти CD68, α -актину гладком'язових клітин і IL-18BP і пов'язані з біотином кінські IgG проти імуноглобуліну кози (Vector) в розведенні 1:200 для визначення антитіл проти IL-18 і рецептора IL-18. Імунозабарвлення візуалізували за допомогою авідин-біотинової HRP системи візуалізації (Vectastain ABC kit PK-6100 Vector). Для негативних контролів паралельні зрізи витримували з відповідними за ізотипом сторонніми антитілами замість перших антитіл.

Виділення РНК

Сумарну РНК екстрагували з 29 атеросклеротичних бляшок в кислому гуанідинтіоціанатному розчині і екстрагували фенолом і хлороформом, згідно зі способом Chomczynski and Sacchi [29]. Виділену РНК розчиняли у воді і концентрацію виміряли поглинанням при 260нм. Міру деградації РНК оцінювали за допомогою електрофорезу на 1%: агарозних гелях кДНК синтезували з 1мкг сумарної РНК, застосовуючи систему оберненої транскрипції Promega згідно з протоколом виробників.

Напівкількісна ПЛР IL-18 і IL-18BP людини з атеросклеротичних бляшок людини, що проводиться в режимі реального часу

Напівкількісні реакції ПЛР проводили в повному об'ємі 50мкл в присутності 1ОД ДНК-полімерази AmpliTaq (Perkin Elmer, Roche, U.S.A.), 2,5мМ dNTP (Amersham, U.S.A.) і 50пмоль прямих і обернених ПЛР-праймерів. Реакційні суміші інкубували в PTC-200 Peltier Effect Thermal Cycler (MJ Research, U.S.A.) при наступних умо-

вах: денатурація 1хв. при 94°C, відпалювання протягом 1хв. при 55°C і елонгація протягом 1хв. при 72°C. Для переконання наявності відповідної кількості ПЛР-продуктів протягом лінійної стадії ПЛР-реакції IL-18BP, IL-18 і β -актину аналізували після 25, 28 і 31 цикли. Встановлювали оптимальну кількість циклів для IL-18BP, IL-18 і β -актину до насичення смуг (31, 28 і 25 відповідно). ПЛР-праймери підбирали на основі описаних послідовностей [AF110799, D49950, X00351], що є наступними: IL-18, обернена 5'-GCGTCACTACACTCAGCTAA-3'; пряма 5'-GCCTAGAGGTATGGCTGTAA-3'; IL-18BP, пряма 5'-ACCTGTCTACCTGGAGTGAA-3'; обернена 5'-GCACGAAGATAGGAAGTCTG-3'; β -актин, обернена 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'; пряма 5'-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3'. Для виключення ампліфікації можливої геномної ДНК, що присутня у зразках, реакції ПЛР проводили у відсутності матриці кДНК. ПЛР-продукти (10мкл) аналізували на 1% агарозних гелях, проводячи електрофорез в 1-кратному буфері ТАЕ. Розмір ПЛР-продуктів визначали порівнянням з послідовно розташованими у вигляді драбини забарвленими смугами в 1т.п.н. на гелях. (Gibco). Відносну кількісну оцінку смуг, забарвлених бромистим етидієм, проводили під впливом УФ-світла за допомогою Kodak Digital Sciences analytical software, і відмічали як співвідношення шуканого гена (hIL-18BP, hIL-18) до контрольного диспетчерського гена (h β -актин).

Праймери SYBR Green Real Time PCR для IL-18, IL-18BP і GAPDH (контрольний контрольно-диспетчерський ген) підбирали за допомогою Primer Express software from PE Biosystems згідно з опублікованими послідовностями [AF110799, D49950, MM 002046], які є наступними: IL-18, обернена 5'-CAGCCGCTTTAGCAGCCA-3'; пряма 5'-CAAGGAATTGTCTCCAGTGC-3'; IL-18BP, обернена 5'-AACCAGGCTTGAGCGTTCC-3'; пряма 5'-TCCCATGTCTCTGCTCATTTAGTC-3'; GAPDH, обернена 5'-GATGGGATTTCCATTGATGACA-3'; пряма 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'; інтрон-GAPDH, обернена 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'; пряма 5'-CTGTGCTCCCACTCCTGATTTC-3'. Оцінювали специфічність і оптимальну концентрацію праймера. Можливе забруднення геномної ДНК виключали за допомогою проведення ПЛР-реакцій за специфічними праймерами інтрон-GAPDH. Відсутність неспецифічної ампліфікації встановлювали за аналізом ПЛР-продуктів за допомогою електрофорезу в 3,5% агарозному гелі. ПЛР SYBR Green Real Time проводили із застосуванням 5мкл/ямку ОТ-продуктів (0,5нг сумарної РНК), 25мкл/ямку SYBR Green PCR master mix (PE Biosystem, CA, USA) з урацил-N-глікозилазою AmpErase (UNG) (0,5Од/ямку) і 20мкл праймерів (300нМ). ПЛР проводили при 50°C протягом 2хв. (для інкубації з AmpErase UNG для видалення всього урацилу, вбудованого в кДНК), 95°C протягом 10хв. (для активації AmpliTaq Gold) і далі проходження 40 циклів при 95°C протягом 15сек., 60°C протягом 1хв. на ABI PRISM 7700 Detection system. Обернено транскрибовані зразки кДНК таким чином ампліфікували і визначали значення їх Ct (граничного значення циклів). Всі Ct-величини нормалізували по відношенню до контрольно-диспетчерського гена GAPDH. Окремі специфічні смуги ДНК для IL-18, IL-18BP і GAPDH одержували за допомогою гель-електрофорезу.

Принцип визначення в режимі реального часу за допомогою «SYBR Green PCR master mix» заснований на безпосередньому визначенні ПЛР-продуктів за допомогою вимірювання збільшення флуоресценції внаслідок скріплення барвника SYBR Green з подвійним ланцюгом ДНК.

Статистичний аналіз

Дані представлені у вигляді середніх величин \pm станд. помилка.

Рівні IL-18 порівнювали між групами за допомогою тесту Манна-Уїтні. Значення $p < 0,05$ розглядали як статистично значуще.

Приклад 1: Запобігання інгібіторами IL-18 загибелі ендотеліальних клітин, індукованій окисленими ліпопротеїнами (oxLDL)

Культивовані ендотеліальні клітини пупкової вени людини (HUVEC) інкубували протягом 16 годин разом з oxLDL в присутності або у відсутності IL-18-зв'язуючого білка або антитілу проти IL-18. Як представлено на Фіг.1, 83% HUVEC гинуть після інкубації з oxLDL. Спільна інкубація з IL-18BP або антитілами проти IL-18 майже повністю оберігає клітини від загибелі. При застосуванні IL-18BP не було відмічено загибелі. При застосуванні антитілу проти IL-18 89% клітин вижили.

Даний експеримент ясно показує захисний ефект двох різних інгібіторів IL-18, направлений проти загибелі клітин в результаті апоптозу в атеросклеротичній бляшці.

Приклад 2: Експресія білка IL-18 і його ендогенного інгібітору IL-18BP в атеросклеротичних бляшках

Вестерн-блотинг проводили для білкових екстрактів, одержаних з 12 атеросклеротичних сонних артерій і 5 нормальних контролів. Білок IL-18, включаючи активну форму, високо експресувався у всіх атеросклеротичних бляшках, незважаючи на виявлення невеликої експресії або її відсутності в нормальних артеріях (Фіг.2). Лінії 1-4 містять зразки з атеросклеротичних бляшок, лінії 5-7 з нормальних артерій. Цікаво, визначення активної форми IL-18 можливо корелює з експресією активної форми каспази-1, яка бере участь в процесінгу IL-18 (Фіг.2 четвертий ряд). Значна експресія білка рецептора IL-18 (α -ланцюг) також виявлена у всіх атеросклеротичних бляшках в порівнянні з дуже низьким рівнем експресії в нормальних артеріях (Фіг.2 другий ряд). Крім того, більшість атеросклеротичних бляшок експресує IL-18BP, хоча рівень експресії гетерогенний (Фіг.2 перший ряд).

Приклад 3: Клітинна локалізація білка IL-18 і його ендогенного інгібітору IL-18BP в атеросклеротичних бляшках

Для встановлення клітинної локалізації IL-18 і IL-18BP проводили імуногістохімічні дослідження на 6 атеросклеротичних бляшках сонних артерій. Як представлено на Фіг.2, IL-18 в основному експресується в макрофагах, дані клітини, можливо, є головним джерелом IL-18 в бляшці (не показано). Дані області також багаті CD3-позитивними лімфоцитами. Однак не видно, що Т-лімфоцити безпосередньо беруть участь в продукуванні IL-18. IL-18 також експресується в деяких гладком'язових клітинах інтими і в рідкісних ендотеліальних клітинах. Навпаки, значну експресію IL-18BP виявили в ендотеліальних клітинах бляшки мікросудин і в їх поверхні з боку просвіту, хоча експресію у всіх судинах не виявили. Відносно низьку і більш гетерогенну експресію IL-18BP також виявили, в основному екстрацелюлярно, в деяких багатих макрофагами областях.

Приклад 4: Експресія транскриптів мРНК IL-18 і IL-18BP в атеросклеротичних бляшках і взаємозв'язок з нестабільністю бляшки

Для встановлення наявності експресії мРНК IL-18 і IL-18BP в атеросклеротичних бляшках сонної артерії людини проводили напівкількісну ОТ-ПЛР на шести атеросклеротичних бляшках (Фіг.3). мРНК IL-18 і IL-18BP виявили у всіх атеросклеротичних бляшках, хоча кількість мРНК IL-18 і IL-18BP була гетерогенною. Тому, для точного кількісного визначення рівнів експресії мРНК IL-18 і IL-18BP додатково аналізували 23 атеросклеротичні бляшки за допомогою методу SYBR Green Real-Time PCR (Фіг.4). Бляшки характеризували за допомогою клінічних і патологічних ознак як симптоматичні (нестабільні) або асимптоматичні (стабільні) бляшки, що містять макроскопічно визначені покриття виразками або не містять. Клінічні характеристики пацієнтів підсумовані в Таблиці 4. Процентне значення зменшення діаметра сонної артерії (60%-95%) і фактори ризику, що включають вік, діабет, гіперхолестеринемію, гіпертензію і куріння, не відрізнялися для двох груп.

Таблиця 4

Характеристики пацієнтів

	Асимптоматичні пацієнти (n=9) 66,9±4,0	Симптоматичні пацієнти ¹ (n=14) 70,2±3,9
Вік		
Стать	Чоловіча (8)	Чоловіча (9)
Гіпертензія ²	8	9
Гіперхолестеринемія ³	4	8
Діабет	3	1
Куріння в цей час	7	8
Захворювання коронарних артерій	5	4

¹ Представлені пацієнти з транзиторним або скороминущим ішемічним порушенням мозкового кровообігу за 2-66 днів до ендартеректомії.

² Кількість пацієнтів з клінічно вираженою гіпертензією перед початком лікування антигіпертензивними препаратами.

³ Кількість пацієнтів з клінічно вираженою гіперхолестеринемією перед початком лікування препаратами, що знижують рівень ліпідів.

Виявили, що кількість IL-18 схильна до позитивної регуляції в симптоматичних в порівнянні з асимптоматичними бляшками (2,03±0,5 проти 0,67±0,17 відповідно) (Фіг.4A). Статистичний аналіз показав, що дане збільшення продукції IL-18, що спостерігається в симптоматичних бляшках, є високо значущим (p<0,0074), в той час як знижена кількість IL-18BP, що виявляється в симптоматичних бляшках в порівнянні з асимптоматичними, не є значущою (4,64±0,98 проти 2,5±0,92 відповідно) (Фіг.4B). Іншими словами, хоча обидві симптоматична і асимптоматична групи виявляють позитивну кореляцію між мРНК IL-18 і IL-18BP, кути нахилу значно відрізняються між 2 групами (симптоматична група: кут нахилу 1,16 [0,19-2,14], $r^2=0,36$ проти асимптоматичної групи: кут нахилу 4,79 [2,39-7,20], $r^2=0,76$; p<0,05). Тому передбачається, що відносне збільшення експресії IL-18BP в симптоматичній групі не є достатнім для компенсації збільшення експресії IL-18. Більш того при розгляді наявності покриття виразками як ознаки нестабільності бляшки статистичний аналіз додатково проводили для бляшок без покриття виразками або з покриттям виразками всередині бляшки і показали істотну позитивну регуляцію IL-18 для бляшок з наявністю покриття виразками (p<0,018) (Фіг.4C).

Одержані дані показують, що збільшення експресії IL-18, що спостерігається в атеросклеротичних бляшках, корелює з нестабільністю бляшки.

Приклад 5: Регуляція IL-18BP розвитку і стабільності атеросклеротичного ураження на моделі захворювання in vivo

Методи

Характеристика пацієнтів

Зразки плазми одержували від пацієнтів з гострим ішемічним коронарним синдромом (нестабільна стенокардія і інфаркт міокарда), менше ніж 7 днів опісля після появи симптомів. Нестабільну стенокардію встановлювали за асоціацією типового загроудинного болю разом з або ішемічними змінами на електрокардіограмі, або присутністю захворювання коронарних артерій. Інфаркт міокарда діагностували на основі типових ішемічних змін на електрокардіограмі, асоційованих зі значним підвищенням ферментів міокарда (креатинфосфокинази і тропоніну I) в крові. Пацієнти без ішемії були набрані в цей кардіологічне відділення і зовсім не виявляли ознак ішемії. Рівні IL-18 людини в плазмі визначали за допомогою комерційно доступного набору (MBL, Japan).

Внутрішньом'язове електроперенесення in vivo мишам плазмиди, що експресує IL-18BP

Чотирнадцять мишей самців C57BL/6 apoE KO 14-тижневого віку одержували з 3-тижневим інтервалом 3 ін'єкції плазмиди, що експресує IL-18BP, pCDNA3-IL18BP. Контрольні миші (n=19) одержували ін'єкції контрольної пустої плазмиди. кДНК ізоформи d IL-18BP, виділену як описано (номер доступу # Q9ZOM9) [23], субклонували за сайтами EcoRI/NotI в експресуючий вектор клітин ссавців pCDNA3 під контролем цитомегаловірусного промотора (Invitrogen). Конструкція, позначена 334.уh, представлена на Фіг.5. Контрольна плазміда являла собою подібну конструкцію, позбавлену терапевтичної кДНК. Плазмиду, що експресує IL-18BP, або контрольну плазмиду (60мкг) вводили ін'єкційно в обидва великогомілкові краніальні м'язи миші під анестезією, як описано раніше [13]. Стисло, черезшкірні електричні імпульси (8 електричних сигналів прямокутної форми 200В/см, тривалістю 20мсек. при 2Гц) посиляли за допомогою електроімпульсатора PS-15 (Genetronics, France), застосовуючи два плоских електроди з неіржавіючої сталі, розташовані один від одного на 4,2-5,3мм на кожній стороні ноги.

ELISA mIL-18BP

Плашки покривали протягом ночі g-mIL-18BPd-афінними кролячими поліклональними антитілами (5мкг/ямку). Розчинний mIL-18BP визначали за допомогою пов'язаних з біотином кролячих поліклональних антитіл (0,3мкг/мл), направлених проти g-mIL-18BP E.Coli (Peprotec) з подальшим додаванням пероксидази extravidin (1/1000) (Sigma). Скріплення кролячих поліклональних антитіл оцінювали за допомогою Вестерн-блоту для визначення специфічності mIL-18BP. Рекомбінантний mIL-18BPd, продукований клітинами HEK 293, застосовували як стандарт. Чутливість ELISA становила 5нг/мл.

Аналіз мишей

Кріостатні зрізи (8мкм) одержували з синуса аорти і застосовували для визначення ліпідних відкладень за допомогою Oil червоного, визначення колагену за допомогою Sirius червоного і для імуногістохімічного аналізу, як описано раніше [13]. Зрізи витримували зі специфічними першими антитілами: проти макрофагів миші, клон MOMA2 (BioSource), проти α -актину, кон'юговані з лужною фосфатазою, для гладком'язових клітин і проти CD3 для Т-лімфоцитів (Dako), як описано раніше [13]. Визначення загибелі клітин проводили за допомогою методу TUNEL [13]. CD3-позитивні клітини підраховували мікроскопічно сліпим способом. Атеросклеротичні бляшки в синусі аорти і областях, що забарвлюються позитивно на наявність макрофагів, гладком'язових клітин, колагену або TUNEL, вимірювали за допомогою кількісного комп'ютерного аналізу зображення [NS15000, Microvision], як описано раніше [13]. Інкубуванням з неімуними відповідними за ізотипом імуноглобулінами оцінювали специфічність імунозабарвлення. Специфічність TUNEL оцінювали за допомогою опущення ферменту термінальної дезоксирибонуклеотидилтрансферази. Грудні аорти, розташовані від лівої підключичної артерії до ниркоподібних артерій, фіксували за допомогою 10% буферного розчину формаліну і забарвлювали на відкладення ліпідів за допомогою Oil червоного. Далі їх розрізали в подовжньому напрямі і процентну кількість ліпідних відкладень обчислювали за допомогою кількісного комп'ютерного аналізу зображення [NS15000, Microvision].

Результати

У ході даного дослідження перевіряли гіпотезу про те, що регуляція IL-18/IL-18BP грає вирішальну роль як в атерогенезі, так і в стабільності бляшки. Визначали рівні IL-18 в плазмі пацієнтів з гострими коронарними синдромами (30 чоловіків, 18 жінок, середній вік $66,2 \pm 1,8$ років, з яких 14 мають нестабільну стенокардію і 34 мають інфаркт міокарда) і у контрольних пацієнтів без ішемії, що знаходяться в тому ж кардіологічному відділенні (10 чоловіків, 3 жінки, середній вік $60,0 \pm 5,2$ років). Рівні IL-18 в плазмі були значно підвищені у пацієнтів з гострими коронарними синдромами в порівнянні з контролем ($146,9 \pm 17,1$ проти $73,0 \pm 12,2$ нг/мл відповідно, $p < 0,05$) на відміну від рівнів циркулюючих IL-18BP, які були трохи підвищеними ($20,1 \pm 2,7$ проти $7,5 \pm 2,5$ нг/мл відповідно, $p = 0,06$). Крім того, рівні IL-18 корелювали з важкістю захворювання, оскільки найбільш підвищені рівні були знайдені у пацієнтів з важким ішемічним порушенням серцевої діяльності і клінічними ознаками набряку легких ($224,03 \pm 39,1$ нг/мл, $p < 0,001$ при порівнянні з контролем). Дані результати, одержані для пацієнтів з гострим коронарним захворюванням, разом з попередніми спостереженнями, що IL-18 підвищений в атеросклеротичних бляшках пацієнтів з інсультами [Mallat, 2001], відводять можливу важливу роль регуляції IL-18/IL-18BP в атеросклеротичному процесі.

Тому автори перевірили дану гіпотезу із застосуванням мишей knockout (KO) apoE, у яких спонтанно утворюються атеросклеротичні ураження, подібні людським. Чотирнадцять 14-тижневих мишей самців одержували додавання IL-18BP шляхом внутрішньом'язового електроперенесення in vivo експресуючою плазмідною ДНК, що кодує мишачий IL-18BPd, при цьому 19 відповідних за віком контрольних мишей одержували пусту плазмиду. Електроперенесення плазмиди повторювали кожні 3 тижні і мишей забивали в 23-тижневому віці після 9 тижнів обробки. Рівні мишачого IL-18BP в плазмі були нижчими, ніж граничне значення (5нг/мл), що визначається у мишей apoE KO, що одержували пусту плазмиду. Однак окрема ін'єкція плазмиди, що містить IL-18BP, приводила до високих рівнів IL-18BP в крові з максимумом через 2 дні після ін'єкції ($323,5 \pm 100,9$ нг/мл) і $127,4 \pm 35,4$ нг/мл через 2 тижні. Після 9 тижнів обробки плазмідною, що містить IL-18BP, або пустою плазмідною сироваткові рівні загального холестерину ($489,4 \pm 34,6$ проти $480,8 \pm 36,3$ мг/дл відповідно) і ліпопротеїнів високої щільності ($52,3 \pm 9,4$ проти $48,8 \pm 5,1$ мг/дл відповідно) не відрізнялися між двома групами. Помірне, але достовірне збільшення маси тварин одержували в IL-18BP групі, що обробляється в порівнянні з контрольною групою ($31,8 \pm 0,9$ проти $28,6 \pm 0,8$ г відповідно, $p < 0,05$).

Результат впливу додавання IL-18BP на атеросклероз оцінювали в 2 різних локалізаціях: низхідній грудній аорті і синусі аорти. Грудна аорта була вибрана для визначення ролі IL-18BP в утворенні жирових смужок (атерогенез), оскільки атеросклеротичні ураження грудної аорти завжди відсутні у віці 14 тижнів (дані не представлені), коли починали перенесення IL-18BP. Синус аорти, де атеросклеротичні ураження вже присутні у віці 14 тижнів (дані не представлені), оцінювали відносно розвитку сформованої бляшки і складу, важливого визначального фактора стабільності бляшки. Обробка за допомогою IL-18BP мишей apoE KO достовірно впливає на розвиток атеросклеротичного ураження і розвитку. Оцінка грудної аорти показала помітне зменшення ліпідного відкладення у мишей, що обробляються плазмідною IL-18BP, в порівнянні з пустою плазмідною (Фіг.6). Кількісний комп'ютерний аналіз зображення показав 69% зменшення розміру атеросклеротичних уражень ($p < 0,0001$) (Фіг.6), вказуючи на вирішальну сприяючу роль IL-18 в атерогенезі. Крім того, обробка за допомогою плазмиди, що включає IL-18BP, тільки протягом 9 тижнів достовірно обмежила розвиток сформованої бляшки в синусі аорти (24% зменшення розміру бляшки, $p = 0,01$) в порівнянні з обробкою пустою плазмідною (Фіг.7).

Більш важливо, що склад сформованого ураження, важливий визначальний фактор стабільності бляшки, виявився сильно схильний до впливу обробки IL-18BP. Атеросклеротичні ураження мишей, що обробляються за допомогою плазмиди, що включає IL-18BP, виявили дуже значне 50% зменшення інфільтрації макрофагами ($p < 0,0001$) (Фіг.8), зміст менше 67% Т-лімфоцитів ($p < 0,005$) (Фіг.8) і показали 2-кратне збільшення накопичення гладком'язових клітин ($p < 0,05$) (Фіг.9). Крім того, дані важливі зміни в клітинному складі ураження були асоційовані з достовірним 85% збільшенням вмісту колагену ($p < 0,0005$), що встановили за допомогою фарбування Sirius червоним, і зі зниженням загального вмісту ліпідів.

Тому обробка за допомогою IL-18BP значно ослабляє запальний процес в межах атеросклеротичного

ураження і індукує ознаки процесу відновлення стабільності атеросклеротичних бляшок. Більш того помітне зменшення запального компонента в ураженнях у мишей, оброблених за допомогою IL-18BP, було асоційоване з істотним зниженням загибелі клітин в бляшках ($2,9 \pm 0,9\%$ у оброблених IL-18BP мишей проти $10,5 \pm 3,6\%$ у контролі, $p < 0,05$), отже обмежуючи зростання і тромбогенність безклітинного ліпідного ядра [Mallat, 1999].

Висновки:

Застосовуючи добре вивчену мишачу модель атеросклерозу, подібного людському, представлені вище результати ясно встановили безперечну і вирішальну роль регуляції IL-18 і IL-18BP в утворенні атеросклеротичної бляшки, розвитку і стабільності. Незважаючи на запобігання початковій стадії утворення ураження в грудній аорті, інгібування активності IL-18 за допомогою додавання IL-18BP також сильно впливає на склад сформованого ураження в синусі аорти, індукуючи перемикання на стабільний фенотип бляшки.

Клінічний прогноз пацієнта з атеросклерозом тільки частково залежить від розміру уражень. У цей час широко визнано, що якість (склад бляшки) ураження може бути навіть кращим показником розвитку ішемічних явищ, ніж її розмір. Дійсно важкі клінічні вияви атеросклерозу (інфаркти серця і мозку) є в основному результатом оклюзії просвіту судини тромбом, що утворився при взаємодії з атеросклеротичною бляшкою, що розпадається [19]. Патологічні дослідження показали, що вразливі або нестабільні бляшки, які схильні до розпаду або що розпалися, багаті клітинами запалення і виявляють істотну нестачу вмісту гладком'язових клітин і колагену [20, 21]. Більш того в подібних бляшках показано значне збільшення апоптотичної загибелі клітин, що приводить до утворення високо тромбогенного ліпідного ядра [13, 22]. Чудово, що всі дані ознаки підвищення нестабільності бляшки помітно ослабли у мишей, оброблених IL-18BP, вказуючи, що передача сигналу IL-18 є основним визначальним фактором нестабільності бляшки.

Значущість результатів, одержаних на мишах ароЕ КО, для захворювання людини посилюється виявленням авторами підвищених рівнів циркулюючого IL-18 у пацієнтів з гострими коронарними синдромами і підвищеної продукції IL-18 в нестабільних атеросклеротичних бляшках сонної артерії, відповідальних за інсульт. Дані знахідки в сукупності визначили інгібітори активності IL-18 як новий важливий терапевтичний спосіб запобігання і лікування розвитку атеросклеротичних бляшок і обмеження ускладнень бляшок.

Приклад 6: Підвищені рівні IL-18 корелюють з рецидивними явищами у пацієнтів з серцевою недостатністю

Рівні IL-18 визначали в сироватці кров пацієнтів за допомогою ELISA зі специфічними антитілами проти IL-18.

Загалом обстежували 56 ішемічних або неішемічних пацієнтів з ознаками серцевої недостатності або без неї.

У пацієнтів, що померли пізніше, рівні IL-18 становили $216,0 \pm 41,5$ пг/мл проти $112,2 \pm 12,2$ пг/мл у пацієнтів без летального виходу ($p = 0,0018$).

У пацієнтів з будь-яким рецидивним випадком, таким як смерть, рекурентна ішемія, ревазуляризація, прогресія атеросклерозу або госпіталізація, що періодично повторюється з приводу серцевої недостатності, визначали наступні рівні IL-18: $165,8 \pm 23,8$ проти $107,7 \pm 14,6$ у пацієнтів з відсутністю будь-якого рецидивного випадку ($p = 0,03$).

Дані результати показують, що рівні IL-18 достовірно підвищені у пацієнтів, що мають поганий клінічний прогноз, подібний рецидивним випадкам або навіть смерті.

У зразках крові 16 неішемічних пацієнтів з ознаками серцевої недостатності або без неї визначали рівень IL-18. У пацієнтів, які пізніше померли, рівень становив $199,0 \pm 34,8$ пг/мл проти $95,3 \pm 20,4$ пг/мл у пацієнтів, що вижили ($p = 0,09$).

Пацієнти з будь-яким рецидивним випадком: $146,6 \pm 34,4$ пг/мл IL-18 проти $95,4 \pm 23,9$ пг/мл у пацієнтів з відсутністю будь-якого рецидивного випадку ($p = 0,03$). Хоча відмінність в рівнях IL-18 не досягала статистично значущої величини внаслідок невеликої кількості пацієнтів, можна побачити ясну тенденцію до підвищення рівня IL-18.

У ішемічних пацієнтів рівень IL-18 становив $214,2 \pm 45,9$ пг/мл для пацієнтів, що померли проти $118,4 \pm 12,8$ пг/мл для пацієнтів, що вижили ($p = 0,007$).

$162,8 \pm 24,7$ пг/мл IL-18 визначали у пацієнтів, що мають будь-який рецидивний випадок, проти $116,2 \pm 16,0$ у пацієнтів з відсутністю будь-яких рецидивних випадків.

Посилання

1. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340:115-126.
2. van der Wai AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. Circulation 1994; 89:36-44.
3. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). N Engl J Med 1992; 326:242-250.
4. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). N Engl J Med 1992; 326:310-318.
5. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. Arterioscler Thromb Vase Biol 1997; 17:1859-1867.
6. Ridker PM, Cusnman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med 1997; 336:973-979.
7. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. Circulation 1995; 91:2844-2850.
8. Nakamura, K, Okamura, H, Nagata, K and Tamura, T. (1989). Infect. Immun. 57, 590-595.
9. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, K (1998). J. Immunol. 161, 3400-3407.
10. Pamet, P, Garka, K E, Bonner, T P, Dower, SK, and Sims, JE. (1996). J. Biol. Chem. 271, 3967-3970.
11. DiDonato, JA, Hayakawa, M, Rothwarf, DM, Zandi, E and Karin, M. (1997). Nature 388, 16514-16517.
12. Novick, D, Kirn, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). Immunity 10, 127-136.
13. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with proco-

agulant potential in human atherosclerotic plaques. A role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99:348-353.

14. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A. Relation Between Endothelial Cell Apoptosis and Blood Flow Direction in Human Atherosclerotic Plaque. *Circulation* 2000; in press.

15. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic due to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 1997; 95:1760-3.

16. Grantham, Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974).

17. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic due to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 1997; 95:1760-3.

18. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Dellere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:4262-7.

19. Lee, R.T. & Libby, P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 17,1859-1867(1997).

20. Davies, M.J. The composition of coronary-artery plaques [editorial; comment]. *N Engl J Med* 336, 1312-1314(1997).

21. Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A. & Schwartz, S.M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 20, 1262-1275. (2000).

22. Kolodgie, F.D. et al. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death [In Process Citation]. *Am J Pathol* 157, 1259-1268 (2000).

23. Kim, S.H. et al. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1190-1195 (2000).

24. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., 1994, *Lancet* 344, 1125-1127.

25. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallan B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993 Nov 30;16 1443-53.

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

27. Engelmänn, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536.

28. Moore WS, Barnett HJ, Beebe HG, et al. Guidelines for carotid endarterectomy. A multidisciplinary consensus statement from the Ad Hoc Committee, American Heart Association. *Circulation* 1995; 91:566-79.

29. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.v.

<120> Застосування інгібіторів IL-18 для лікування і/або запобігання

атеросклерозу

<130> 443 WO

<140> PCT/EP01/04843

<141> 2001-04-30

<150> EP 00109606.4

<151> 2000-05-05

<160> 14

<170> Patentin version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<221> обернений праймер IL-18

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 1

gcgtcactac actcagctaa

20

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> прямий праймер IL-18

<222>

<223>

<400> 2

gcctagaggt atggetgtaa

<210> 3

<211> 20
<212> ДНК
<213> Homosapiens
<220>
<221> прямой праймер IL-18
<222> (1)..(20)
<223>
<400> 3
acctgtctac ctggagtgaa 20
<210> 4
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> оборненный праймер IL-18BP
<222> (1)..(20)
<223>
<400> 4
gcacgaagat aggaagtctg
20
<210> 5
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> оборненный праймер бета-актину
<222> (1)..(24)
<223>
<400> 5
ggaggagcaa tgatcttgat ctfc
24
<210> 6

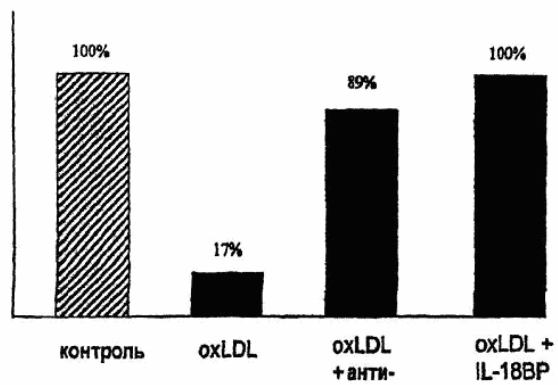
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> прямой праймер бета-актину
<222> (1)..(24)
<223>
<400> 6
gctcaccatg gatgatgata tcgc
<210> 7
<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<221> оборнутый праймер 2IL-18
<222> (1)..(18) <223>
<400> 7
cagccgcttt agcagcca
18
<210> 8
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> прямой праймер 2IL-18
<222> (1)..(21)
<223>
<400> 8
caagggaattg tctcccagtg c
21
<210> 9
<211> 19
<212> ДНК

```

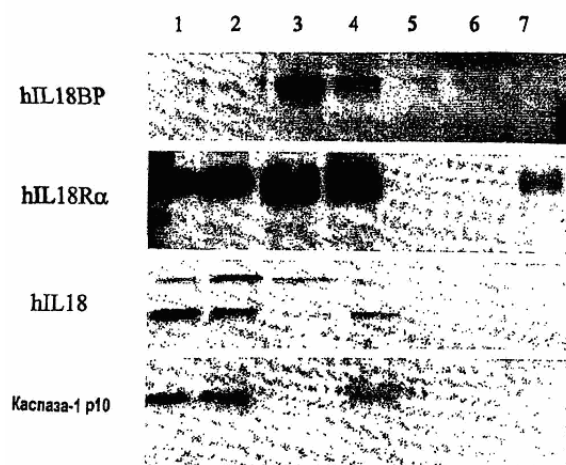
<213> Homo sapiens
<2 21> обернений праймер 2 IL-18BP
<222> (1)...(19)
<223>
<400> 9
аассаggctt gaggcttcc
19
<210> 10
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<2 21> прямой праймер 2IL-18BP
<222> (1)..(24)
<223>
<400> 10
tcccatgtct ctgctcattt agtc
24
<210> 11
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<2 21> обернений праймер GAPDH
<222> (1)..(22)
<223>
<400> 11
gatgggattt ccattgatga ca
22
<210> 12
<211> 18
<212> ДНК

<213> Homo sapiens
<220>
<221> прямой праймер GAPDH
<222> (1)..(18)
<223>
<400> 12
ссасссатgg саааттсс
18
<210> 13
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<2 21> обернений праймер інтрону GAPDH
<222> (1)..(21)
<223>
<400> 13
сctagtccca gggctttgat t
<210> 14
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> прямой праймер інтрону GAPDH,
<222> (1)..(22)
<223>
<400> 14
ctgtqctccc actcctgatt tc
22

```

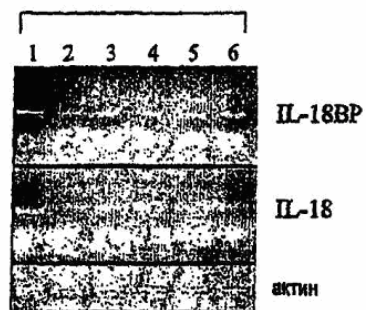


Фиг. 1

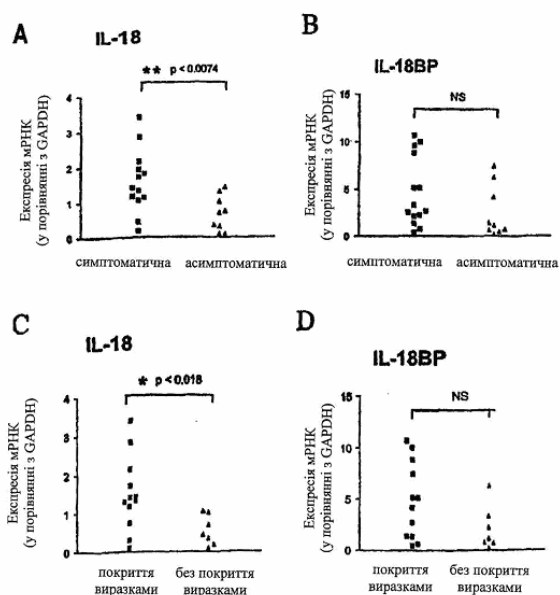


Фиг. 2

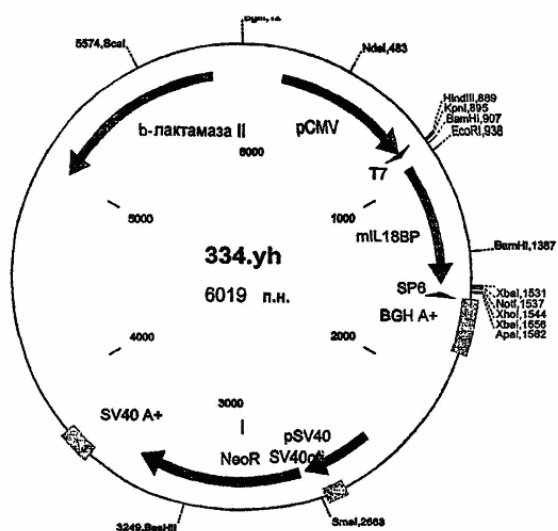
Атеросклеротичні бляшки



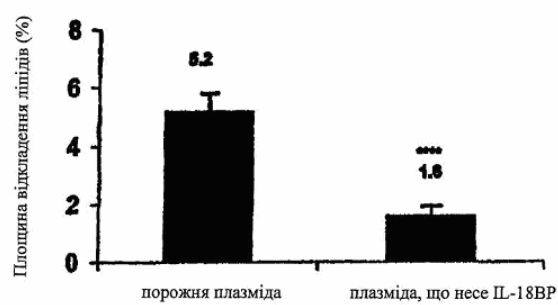
Фиг. 3



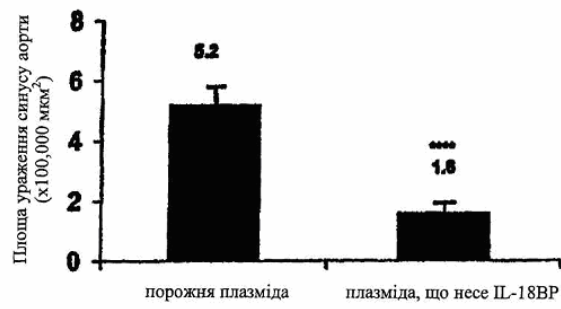
Фіг. 4



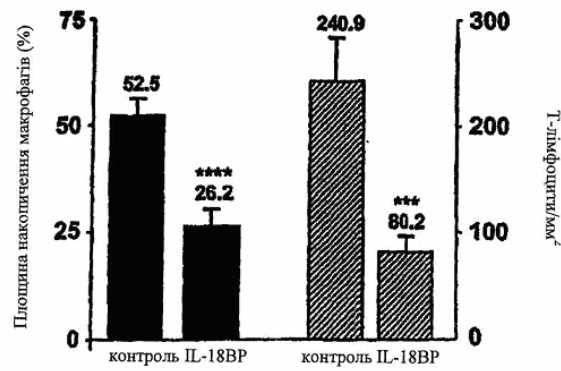
Фіг. 5



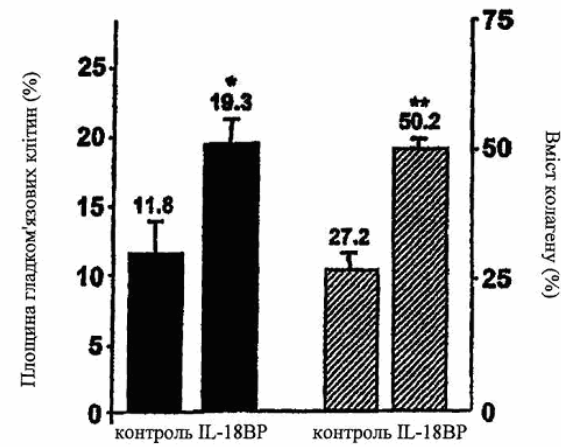
Фіг. 6



Фiг. 7



Фiг. 8



Фiг. 9