



УКРАЇНА

(19) UA (11) 80676 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 39/395

A61K 38/17

A61P 9/10 (2006.01)

A61K 48/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА IL-18 ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ІАБО ПРОФІЛАКТИКИ КАРДІОМІОПАТІЇ**

1

(21) 2003088056  
(22) 28.01.2002  
(24) 25.10.2007  
(86) PCT/EP02/00844, 28.01.2002  
(31) 01101959.3  
(32) 29.01.2001  
(33) EP  
(72) ДІНАРЕЛЛО ЧАРЛЬЗ, ПОМЕРАНЦ  
БЕНДЖАМІН, РЄЗНІКОВ ЛЕОНІД, ХАРКЕН  
АЛЬДЕН, ШВАТШКО ЙОЛАНД  
(73) АППЛАЙД РЕЗЕЧ СІСТЕМЗ АРС ХОЛДІНГ  
Н.В.  
(56) WO A 9909063, 25.02.1999  
Y. SETA ET AL.: "Interleukin-18 in acute myocardial  
infarction." HEART, vol. 84, no. 6, December 2000  
(2000-12), page 668 XP001002516 London, GB  
(57) 1. Застосування інгібітора IL-18 для  
приготування лікарського засобу для лікування  
і/або профілактики кардіоміопатії, де інгібітор IL-18  
вибраний з інгібітору каспази-1 (ICE), антитіл  
проти IL-18, антитіл проти будь-якої субодиниці  
рецептора IL-18 і білків, що зв'язують IL-18, або їх  
ізоформ, мутеїнів, злитих білків або  
функціональних похідних, які інгібують біологічну  
активність IL-18.  
2. Застосування за п. 1, де інгібітор IL-18 являє  
собою антитіло до IL-18.  
3. Застосування за п. 1, де інгібітор IL-18 являє  
собою антитіло до рецептора  $\alpha$  IL-18.  
4. Застосування за п. 1, де інгібітор IL-18 являє  
собою антитіло до рецептора  $\beta$  IL-18.  
5. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів,  
де антитіло є гуманізованим або людським  
антитілом.  
6. Застосування за п. 1, де інгібітор ICE являє  
собою Ас-Тур-Val-Ala-Asp-хлорметилкетон (YVAD).  
7. Застосування за п. 1, де даний інгібітор IL-18 є  
білком, що зв'язує IL-18, або ізоформою, мутеїном,  
злитим білком або функціональним похідним, яке  
інгібує біологічну активність IL-18.

2

8. Застосування за п. 6, де інгібітор IL-18  
гліколізований по одній або декількох ділянках.  
9. Застосування за п. 6 або 7, де злитий білок  
містить у собі білок злиття імуноглобуліну (Ig).  
10. Застосування за будь-яким з пп. 6-8, де  
функціональне похідне включає щонайменше  
один радикал, зв'язаний з однією або декількома  
функціональними групами, які представлені у  
вигляді одного або декількох бічних ланцюгів в  
амінокислотних залишках.  
11. Застосування за п. 10, де вказаний радикал  
являє собою поліетиленовий радикал.  
12. Застосування за будь-яким з попередніх  
пунктів, в яких лікарський засіб додатково включає  
антагоніст Фактора Некрозу Пухлини (TNF).  
13. Застосування за п. 11, де вказаний інгібітор IL-  
18 використовують одночасно, послідовно або  
роздільно з антагоністом TNF.  
14. Застосування за п. 12 або 13, де антагоніст  
TNF являє собою TBPI і/або TBPII.  
15. Застосування за будь-яким з попередніх  
пунктів, де інгібітор IL-18 використовують у  
концентрації, що коливається приблизно від 0,001  
до 100 мг/кг або приблизно від 1 до 10 мг/кг, або  
від 2 до 5 мг/кг.  
16. Застосування експресуючого вектора, який  
містить послідовність, що кодує інгібітор IL-18, для  
приготування лікарського засобу для лікування  
і/або профілактики кардіоміопатії, де інгібітор IL-18  
вибраний з антитіл проти IL-18, антитіл проти  
будь-якої субодиниці рецептора IL-18 і білків, що  
зв'язують IL-18, або їх ізоформ, мутеїнів, злитих  
білків, які інгібують біологічну активність IL-18.  
17. Застосування експресуючого вектора для  
індукції і/або посилення ендогенного утворення  
інгібітора IL-18 у клітині для приготування  
лікарського засобу для лікування і/або  
профілактики кардіоміопатії, де інгібітор IL-18  
вибраний з білків, що зв'язують IL-18, або їх  
ізоформ, які інгібують біологічну активність IL-18.

(19) UA (11) 80676 (13) C2

Даний винахід відноситься до області серцево-судинних захворювань. Більш конкретно, він відноситься до застосування інгібітору IL-18 для лікування і/або профілактики захворювання серця, зокрема, ішемічної хвороби серця.

Цитокін інтерлейкін-18 (IL-18) був спочатку описаний як фактор, що індукує  $\gamma$ -інтерферон (IFN- $\gamma$ ) (Nakamura і співавт., 1989). Він є раннім сигналом розвитку відповідей Т-хелперних лімфоцитів тину 1 (TH1). IL-18 діє разом з IL-12, IL-2, антигенами, мітогенами і, можливо, з іншими додатковими факторами, які індукують продукцію IFN- $\gamma$ . IL-18 посилює також продукцію GM-CSF і IL-2, потенціює Т-клітинну проліферацію, що індукується анти-CD3, та підвищує опосередкований Fas клінінг природних кілерних клітин.

Зрілий IL-18 продукується зі свого попередника за допомогою IL-1 $\beta$ -перетворюючого ферменту (ICE, каспаза-1).

Рецептор IL-18 складається, щонайменше, з двох компонентів, які взаємодіють при зв'язуванні ліганду. Сайти зв'язування IL-18 з високою і низькою спорідненістю були виявлені у мишачих Т-клітинах, стимульованих IL-12 [Yoshimoto і співавт., 1998], що дозволяє припустити наявність багатоланцюгового рецепторного комплексу. Поки ідентифіковані дві рецепторні субодиниці, які обидві відносяться до сімейства рецепторів IL-1 [Parnet і співавт., 1996; Kit і співавт., 2001]. Передача сигналу IL-18 включає в себе активацію NF- $\kappa$ B [DiDonato і співавт., 1997]. Комплекс рецептора IL-18 складається з двох рецепторних ланцюгів: ланцюг IL-18Ra називають ліганд-зв'язувальним ланцюгом, а ланцюг IL-18Rp називають ланцюгом, що передає сигнал. Ланцюг IL-18R виділили спочатку у вигляді білка клітинної поверхні, що зв'язує радіоактивно мічений IL-18; даний білок виділили і виявили ідентичність його амінокислотної послідовності з раніше описаним орфановим рецептором, який називається IL-1R-зв'язаним білком (IL-1Rrp), [Torioe і співавт., 1997].

Нещодавно з людської сечі був виділений розчинний білок, який володіє високою спорідненістю проти IL-18, і клоновані КДНК людини і миші, а також людський ген [Novick і співавт., 1999; WO 99/09063]. Даний білок одержав назву IL-18-зв'язувальний білок (IL-18BP).

IL-18BP не є позаклітинним доменом жодного з відомих рецепторів IL-18, а являє собою природно циркулюючий білок. Він відноситься до нового сімейства білків, що секретуються, яке, крім того, включає в себе декілька білків, що кодується поксвірусом (Novick і співавт., 1999)! IL-18BP з сечі, як і рекомбінантний IL-18BP, з високою спорідненістю специфічно зв'язують IL-18 і регулюють біологічну спорідненість IL-18.

Ген IL-18BP локалізований у хромосомі 11q13 людини, і у геномній послідовності довжиною 8,3 т.п.н. не виявляється екзон, який кодує трансмембранний, домен. На сьогоднішній день у людини знайдені чотири варіанти або ізоформи сплайсингу IL-18BP, що утворюються в результаті альтернативного сплайсингу мРНК. Вони

позначені IL-18BP а, б, с і d, причому всі володіють одним і тим же N-кінцем і відрізняються по C-кінцю [Novick і співавт., 1999]. Дані ізоформи варіюють по здатності зв'язувати IL-18. Відомо, що з вказаних чотирьох ізоформ, ізоформи а і с IL-18BP володіють здатністю нейтралізувати IL-18. Ізоформа IL-18BP людини перехресно реагує з мишачим IL-18.

Захворювання серця визначаються як порушення, які впливають на серцевий м'яз або на кровоносні судини серця [The Merck Manual Home Edition, www.merck.com.]. Судинне порушення являє собою порушення діяльності кровоносної судини, наприклад, ослаблення циркуляції крові внаслідок закупорювання. Захворювання серця називають також серцево-судинними порушеннями.

Ішемічна хвороба серця часто викликає серцеву недостатність і у західному співтоваристві є найчастішою причиною смерті. Вона, як правило, обумовлена атеросклеротичною бляшкою у коронарній артерії. Пошкодження міокарда включають ішемічний фіброз і гострий інфаркт. У нормальних умовах кровотік у коронарних артеріях сильно залежить від метаболічних потреб серцевого м'яза. Ішемічна хвороба серця розвивається при недостатньому кровопостачанні внаслідок погіршення самого кровопостачання, або при гіпертрофованому міокарді, який потребує підвищеного кровопостачання. Коронарний кровотік у нормі не залежить від аортального тиску. Існує ефективний механізм, що сам регулюється, який контролює кровотік через коронарне судинне ложе.

Якщо відбувається закупорення великої коронарної артерії, звичайно внаслідок атеросклерозу або артеріосклерозу, то спочатку коронарний кровотік зберігається, оскільки периферичний опір непрохідності зменшений. Якщо просвіт судини закупорений більше ніж на 75%, розвивається ішемія, особливо у випадку, якщо коронарний колатеральний дсровообіг виражений слабо.

Серцевий м'яз надзвичайно метаболічно активний, в окремих його волокнах міститься понад 30% мітохондрій по об'єму. Кисневий обмін істотний, оскільки резерви високоенергетичних фосфатів дуже незначні. При дуже низькому рівні тканинного аденозинтрифосфату (АТФ) і при фактичній зупинці анаеробного гліколізу серцевий м'яз гине. Як і у випадку з іншими тканинами точна причина загибелі незрозуміла, але летальне ураження серцевого м'яза асоціюється з мембранним пошкодженням і раптовим вкиданням кальцію у цитоплазму клітини. Після короткого проміжку часу ішемії кардіальний кровотік може відновитися (реперфузія). Однак після великого інтервалу часу реперфузія неможлива, очевидно, внаслідок набухання ендотеліальних клітин капілярів.

Атеросклероз відповідальний за величезну кількість випадків ішемічної хвороби серця. Ішемічна хвороба серця може також виникати через незначну перфузію коронарних артерій.

Інсульт, особливо геморагічний, часто є причиною її виникнення.

Як вказано вище, ішемічна хвороба серця є результатом дисбалансу між кровопостачанням міокарда і метаболічними потребами міокарда. Крім того, кровотік може зменшитися через накладення таких подій як спазм судин, тромбоз або циркуляторні зміни, які приводять до незначної перфузії.

Перфузія коронарних артерій залежить від різниці тиску між коронарним отвором (аортальний діастолічний тиск) і коронарним синусом (тиск у правому передсерді). Коронарний кровотік зменшується протягом систоли внаслідок ефектів Вентурі у коронарних отворах і стискання внутрішньом'язових артерій під час скорочення шлуночків. Фактори зменшення коронарного кровотоку включають в себе знижений артеріальний діастолічний тиск, підвищений внутрішньошлуночковий тиск і скорочення міокарда, стеноз коронарної артерії, стеноз і регургітацію аортального клапана і підвищений тиск у правому передсерді.

Тромболітична терапія за допомогою таких засобів, як стрептокіназа або тканинний активатор плазміногена (TPA) часто використовують для розчинення тромбу, який нещодавно утворився. Така терапія по розчиненню тромбу може у більшості випадків відновити кровотік. Це допомагає запобігти істотному пошкодженню міокарда, якщо досить рано втрутитися (менш ніж протягом однієї години або близько цього) у даний розвиток подій, і може, щонайменше, допомогти зменшити подальше пошкодження.

Стенокардія є симптомокомплексом ішемічної хвороби серця, що характеризується пароксизмальним нападом болю у грудях, звичайно за грудничного або прекордального. Це обумовлено ішемією міокарда, що не привела до інфаркту. Може виникнути раптова серцева смерть, яка являє собою раптову смерть серцевої етіології, звичайно протягом однієї години виникнення серцевого етіологічного фактора або без виникнення симптомів. Від неї щорічно помирає 300000-400000 людей.

Інші форми захворювання серця включають в себе алкогольну кардіоміопатію, пролабірування стулок аортального клапана, стеноз аортального клапана, аритмії, кардіогенний шок, природжений порок ^серця, дилатаційну кардіоміопатію, серцевий напад, серцеву недостатність, пухлину серця, стеноз легеневого клапана серця, гіпертрофічну кардіоміопатію, ідіопатичну кардіоміопатію, ішемічну хворобу серця, ішемічну кардіоміопатію, регургітацію крові при недостатності мітрального клапана, пролабірування стулок мітрального клапана, кардіоміопатію, зв'язану з родами, стабільну стенокардію.

Інфаркт міокарда являє собою ще одну форму ішемічної хвороби серця. Його патогенез може включати в себе закупорювальний внутрішньокоронарний тромбоз, тобто виникнення тромбу, який покриває укриті виразками або зруйновану бляшку, що стенозує.

Закупорювальний внутрішньокоронарний тромб викликає 90% трансмуральних інфарктів міокарда. Спазм судин може мати місце при коронарному атеросклерозі або за його відсутності і цілком ймовірно асоціюється з агрегацією тромбоцитів. Емболи можуть також відігравати роль у розвитку інфаркту міокарда.

Загальна морфологічна картина інфаркту міокарда може варіювати. Трансмуральний інфаркт міокарда залучає всю товщину стінки лівого шлуночка від ендокарда до епікарда. При субендокардіальному інфаркті міокарда виникають багатоосередкові ділянки некрозу, обмежені 1/3-1/2 внутрішньої стінки лівого шлуночка. Ускладнення інфаркту міокарда можуть включати в себе аритмію та дефекти провідності з можливою "раптовою смертю", розширенням зони інфаркту або повторним інфарктом, застійну серцеву недостатність (набряк легень), кардіогенний шок, перикардит, пристінковий тромбоз з можливою емболізацією, розрив стінки міокарда з можливою тампонадою, відрив папілярних м'язів з можливою клапанною недостатністю, утворення аневризми шлуночка.

Інфаркт міокарда (ІМ) визначають як ішемічний некроз міокарда, що звичайно розвивається внаслідок раптового зменшення коронарного кровотоку на ділянці міокарда.

У більше ніж 90% хворих гострим ІМ гострий тромб, часто зв'язаний з руйнуванням бляшки, закупорює дану артерію (раніше частково перекриту атеросклеротичною бляшкою), яка живить пошкоджену ділянку. Змінена функція тромбоцитів, яка індукується зміною ендотелію в атеросклеротичній бляшці, здійснює основний внесок у тромбогенез. Приблизно у 2/3 пацієнтів відбувається спонтанний тромболіз, так що через 24 години тромботична оклюзія спостерігається лише приблизно у 30%.

Іноді інфаркт міокарда викликаний артеріальною емболізацією (наприклад, при стенозі мітрального клапана або стенозі устя аорти, інфекційному ендокардиті, і токсичному ендокардиті). Повідомлялося про інфаркт міокарда у пацієнтів при коронарному спазмі та при нормальних за іншими показниками коронарних артеріях. Кокаїн викликає сильний спазм коронарних артерій і у його споживачів може розвинути викликана кокаїном стенокардія або інфаркт міокарда. Вивчення секційного матеріалу і коронарна ангіографія показали, що викликаний кокаїном коронарний тромбоз може виникнути у нормальних коронарних артеріях або внаслідок складання з передіснуючою бляшкою.

Інфаркт міокарда переважно є захворюванням лівого шлуночка, але пошкодження може поширитися і на правий шлуночок (RV) або на праве передсердя. Інфаркт правого шлуночка звичайно виникає через оклюзію правої коронарної або основної лівої артерії, що огинає, і характеризується високим тиском при заповненні правого шлуночка, часто з тяжкою регургітацією тристулкового клапана і зниженим серцевим викидом. Деяка дисфункція правого шлуночка зустрічається приблизно у половини хворих

нижньо-задніми інфарктами, приводячи до порушення гемодинаміки у 10-15%.

Здатність серця продовжити функціонувати як насос безпосередньо зв'язана із ступенем пошкодження міокарда.

Трансмуральні інфаркти зачіпають міокард по всій його товщині від епікарда до ендокарда і, як правило, характеризуються на ЕКГ аномальними зубцями Q. Нетрансмуральні, або субендокардіальні, інфаркти не поширюються на всю стінку 'плучка і викликають аномалії лише сегмента ST і зубця T. Субендокардіальні інфаркти зачіпають внутрішню 1/3 міокарда, де натяг стінки найбільший, а кровотік у міокарді найбільш чутливий до змін циркуляції. Вони можуть також йти за тривалою гіпотензією. Оскільки трансмуральну глибину некрозу неможливо точно визначити клінічно, інфаркти краще за все класифікувати за допомогою ЕКГ за наявності і відсутності зубця Q. Об'єм ураженого міокарда можна оцінити за величиною і тривалістю підвищення вмісту СК.

Іншим захворюванням у рамках ішемічної хвороби серця є ішемічна кардіоміопатія. Цьому стану може передувати інфаркт міокарда, але дане захворювання є наслідком тяжкого коронарного атеросклерозу, який вражає всі основні судинні гілки. Результатом є недостатнє кровопостачання, що приводить до загибелі міоцитів. Втрата міоцитів, зв'язана з фіброзом у вигляді інтерстиціального відкладення колагену, приводить до зменшення еластичності, що поряд з розширенням серця приводить до перевантаження міоцитів, які залишилися. Даний процес продовжується, компенсуючись безперервною гіпертрофією міоцитів. Можлива навіть компенсація за допомогою гіперплазії, а також гіпертрофії, що може пояснити величезний розмір (у 2-3-рази більше нормального) серця. Зрештою, таке серце вже не може компенсувати, і у результаті настає серцева недостатність з аритміями і/або ішемічними нападами. Таким чином, клінічно відмічається повільно прогресуюча серцева недостатність, з інфарктом міокарда або стенокардичним боєм або без таких в анамнезі. Ішемічна кардіоміопатія відповідальна не менше ніж за 40% летальних кінців при ішемічній хворобі серця.

Під час ішемії, а також реперфузії серця, секретуються численні ендogenousні медіатори, наприклад, такі як низькомолекулярні вторинні месенджери, які впливають на функцію міокарда. У хвилини ішемічного нападу скорочувальна здатність міокарда знижується, а повне відновлення сили скорочень здебільшого сильно залежить від тривалості ішемічного періоду [Daemen і співавт., 1999]. Наприклад, під час ішемічного нападу порушується гомеостаз  $Ca^{2+}$ , генеруються активні форми кисню та відбувається синтез і вивільнення оксиду азоту (NO). Крім того, відбувається також місцева продукція цитокінів, зокрема, TNF $\alpha$  і IL-1 $\beta$  [Bolli, 1990]. У непошкоджену серці дані цитокіни здійснюють свій внесок у дисфункцію міокарда, викликану ішемією, індукуючи експресію генів NO-синтази

(iNOS), що індукується, [Daemen і співавт., 1999], циклооксигенази-2 (COX-2) і фосфоліпази A2, а також судинних молекул адгезії та деяких хемокінів. У результаті відмічається негайне пригнічення скорочувальної здатності міокарда, опосередковане низькомолекулярними месенджерами з подальшою цитокін-опосередкованою нейтрофільною інфільтрацією, що ще більше ушкоджує серцевий м'яз. Серця тварин, досліджені за відсутності крові або продуктів крові, виробляють протягом індукованої ішемії TNF $\alpha$  [Herskowitz і співавт., 1995] і IL-1 $\beta$ . Кардіоміоцити також втрачають скорочувальну здатність внаслідок дії цих ендogenousних цитокінів [Meldrum і співавт., 1998].

Більшість експериментальних даних, що стосуються TNF $\alpha$  і IL-1 $\beta$ , які опосередковують дисфункцію міокарда, одержані у дослідженнях на тваринах. Разом з тим, тканини людського міокарда, одержані від пацієнтів, які зазнали деякої операції в умовах штучного кровообігу, вивчають у контрольованих *ex vivo* умовах [Gurevitch і співавт., 1996; Cleveland і співавт., 1997]. У цій експериментальній моделі трабекули передсердя людини суспендують у безкровному фізіологічно оксигенованому буфері і потім моделюють напад ішемії. Протягом цього часу різко зменшується скорочувальна здатність; коли до даної тканини відновлюють доступ кисню, її скорочувальна здатність повертається, хоча і не повністю (60-70% зниження), та існує свідчення пошкодження міокарда, що спостерігається по вивільненню креатинкінази (СК) [Gurevitch і співавт., 1996; Cleveland і співавт., 1997]. Якщо біологічну активність TNF специфічно нейтралізувати під час ішемії/реперфузії (I/R), то спостерігається краще відновлення скорочувальної здатності, що дозволяє припустити, що активність ендogenousного TNF міокарда сприяє скорочувальній дисфункції, обумовленій ішемічним нападом [Cain і співавт., 1999].

Daemen і співавт. (1999) досліджували тканинне пошкодження внаслідок ішемії з подальшою реперфузією, використовуючи мишачу модель ішемії нирки. Вони показали, що позитивна регуляція мРНК IL-18 нирки співпадає на першу добу після ішемії з активацією каспази-1. Згодом мРНК IFN- $\gamma$  і IL-12 піддавалися позитивній регуляції на 6 добу після ішемії. Об'єднана, а не роздільна, нейтралізація *in vivo* цитокінів IL-12 і IL-18, які індукують IFN- $\gamma$ , зменшує залежну від гамма-IFN позитивну регуляцію МНС класів I і II, до ступеню, відповідного такому при нейтралізації IFN- $\gamma$ .

Однак досі не повідомлялося про роль IL-18 у розвитку захворювань серця.

В основу даного винаходу покладений той факт, що інгібітор IL-18 істотно поліпшує скорочувальну функцію серця в ішемічній/реперфузійній моделі з посиленою реперфузією передсердя міокарда людини. Інгібування каспази-1 (ICE) також ослаблює зниження скорочувальної здатності після ішемії та реперфузії.

Крім того, введення інгібітору IL-18 у мишачій моделі інфаркту міокарда приводило до підвищення виживаності та істотного поліпшення функції шлуночка.

Дані дослідження свідчать, що інгібітори IL-18 придатні для лікування або профілактики дисфункції міокарда.

Тому даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для приготування лікарського засобу для лікування і/або профілактики хвороби серця, зокрема, ішемічної хвороби серця і/або серцевої недостатності.

Крім того, даний винахід відноситься до використання експресуючого вектора, який містить кодуючу послідовність інгібітору IL-18 для лікування і/або профілактики хвороби серця, з тим, щоб застосувати генно-терапевтичний підхід для доставки інгібітору IL-18 у хвору тканину або клітину.

Короткий опис креслень

На Фіг.1 показана дія IL-18BP на викликану ішемією дисфункцію скоротності міокарда.

(А) Кінетична реакція на ішемічне пошкодження. Після зрівноважування (eq), протягом даного експерименту контрольні трабекули піддають посиленій перфузії в умовах нормальної оксигенації. Трабекули піддають ішемії/реперфузії за відсутності або у присутності IL-18BP (5мкг/мл). На вертикальній осі вказане виражене у відсотках зусилля, що розвивається, у порівнянні з початком даного експерименту (початок відліку часу). Ці дані одержані для трабекул окремого пацієнта і показові для способів, що використовуються для обчислення середньої зміни зусилля, що розвивається, за 90 хвилин.

(В) Постішемічне зусилля, що розвивається, після нейтралізації IL-18 за допомогою 1-5мкг/мл IL-18BP. Результати представлені у вигляді середньої відсоткової зміни зусилля, що розвивається, відносно Ctrl (контролю) після завершення реперфузії (90 хвилин). Числа у дужках відповідають IL-18BP умкг/мл. N=6. \* $p < 0,01$  у порівнянні з I/R (ішемія/реперфузія).

Фіг.2: показує вміст у міокарді білка IL-18. Трабекули гомогенізують після 90 хвилин посиленої перфузії в умовах нормальної оксигенації (контроль) або через 45 хвилин після 30 хвилин ішемії (I/R). Від одних і тих же суб'єктів зібрані рівноцінні трабекули. Рівні IL-18 вказані на вертикальній осі у пкг/мл. N=4. \* $p < 0,01$ .

Фіг.3: показує стаціонарні рівні мРНК IL-18 і IL-18BP у контролі та в ішемічній тканині передсердь. Рівні IL-18 і IL-18BP визначають за допомогою RT-PCR. Дані характеризують одного суб'єкта (з двох). На А показаний забарвлений бромідом етидію агарозний гель, в якому були розділені продукти ПЛР, а на В представлені результати кількісного аналізу РСТ-продукту у вигляді кратної зміни до контролю (GAPDH).

Фіг.4: показує вплив ICE-інгібування на постішемічну скоротність, яка утворюється. Результати виражені у вигляді середньої відсоткової зміни зусилля, що розвивається, по відношенню до контролю (Ctrl) після

ішемії/реперфузії (I/R). Числа у дужках вказують концентрацію ICEi умкг/мл. N=7. \* $p < 0,01$  у порівнянні з I/R.

Фіг.5: показує активність тканинної креатинкінази (СК) після I/R. СК виражена в одиницях активності на міліграм маси сирової тканини. Дані експериментальні умови вказані під горизонтальною віссю. Ctrl та I/R, N=6; IL-18BP (5мкг/мл), N=5; ICEi (10 і 20мкг/мл), N=5 кожний; \* $p < 0,05$  у порівнянні з I/R.

Фіг.6: показує середню зміну зусилля, що розвивається, трабекул, інкубованих по 10мкг/мл протягом 15 хв. перед додаванням TNFa (1 нг/мл), відносно, взятого за 100% (n=5), зусилля, що розвивається, після періоду зрівноважування. TNFa і IL-18BP додають у кожну змінювану ванну.

Фіг.7: показує реакцію трабекул передсердь людини у часі в умовах нормальної оксигенації. Зрілий IL-18 (100 нг/мл) додають до трабекул передсердь протягом 90 хв. експериментального часу. На вертикальній осі вказана середня відсоткова зміна від вихідної лінії зусилля, що розвивається. Вихідну лінію визначають у кінці періоду зрівноважування (не показано). (n=6). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$  у порівнянні з контролем в одному і тому ж інтервалі та протягом експериментального періоду, що залишився.

Фіг.8: показує збереження креатинкіназної активності м'язової тканини після впливу I/R, TNFa (1 нг/мл) і TNFa (10 мг/мл) + IL-18BP. Активність СК виражають в одиницях СК-активності на міліграм маси сирової тканини. (n=6).

В основу даного винаходу покладений той факт, що інгібітори IL-18 здійснюють сприятливий ефект при захворюваннях серця, зокрема, при ішемічній хворобі серця. Як показано нижче у прикладах, декілька різних інгібіторів IL-18 здійснюють істотний сприятливий ефект на створену постішемічну скоротність серцевого м'яза.

Крім цього, інгібітор IL-18, перевірений на моделі in vivo інфаркту міокарда, підвищує виживаність та істотно поліпшує функції шлуночка.

Тому даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для приготування лікарського засобу для лікування і/або профілактики захворювання серця.

Відповідно до даного винаходу термін "захворювання серця" охоплює захворювання, що включають дисфункцію даного серця. Звичайно їх називають також серцево-судинними захворюваннями.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу захворювання серця являє собою ішемічну хворобу серця.

Термін "ішемічна хвороба серця", що використовується тут, включає всі можливі види ішемічної хвороби серця, включаючи без обмеження, захворювання, детально описані у розділі "Передумови винаходу", а також серцево-судинні захворювання, зв'язані з ішемічною хворобою серця.

Застосування за даним винаходом дуже підходить для тривалого лікування і, таким чином, особливо застосовне для використання при

хронічних захворюваннях серця. Таким чином, у переважному варіанті здійснення даного винаходу ішемічна хвороба серця є хронічною. Стенокардія, або *angina pectoris*, є одним з найбільш звичайних клінічних симптомів у пацієнтів з тривалою історією ішемічної хвороби серця. Ослаблення функції лівого шлуночка після одного або декількох інфарктів міокарда може привести до лівошлуночкової і, у кінцевому результаті, до застійної серцевої недостатності. Тому даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 для лікування і/або профілактики стенокардії.

У наступному переважному варіанті здійснення даного винаходу ішемічна хвороба серця протікає гостро і, більш переважно, являє собою інфаркт міокарда.

Гострий інфаркт міокарда звичайно включає в себе некроз серцевого м'яза, звичайно лівого шлуночка. Він часто викликаний атерою коронарної артерії з накладенням тромбу або крововиливом у бляшку. За некрозом йде запальна інфільтрація, вивільнення у кров репаративних ферментів з'єднувальної тканини з некротичного м'яза і лейкоцитоз, які можуть використовуватися для діагностики. Ускладнення гострого інфаркту міокарда включають в себе аритмії, серцеву недостатність, розрив міокарда, що приводить до гемоперикарду, пристінковий тромбоз, який веде до емболії, та аневризму серця. Інші ускладнення включають в себе раптову смерть, аритмії, персистувальний, біль, стенокардію, серцеву недостатність, недостатність мітрального клапана, перикардит, розрив міокарда (шлуночковий біль, відрив міжшлуночкової трабекули або папілярного м'яза), пристінковий тромбоз, аневризму шлуночка, синдром Дреслера (біль у грудях, лихоманка, випоти), емболію легеневої артерії. Лікарський засіб відповідно до даного винаходу можна також використовувати для лікування і/або профілактики цих ускладнень інфаркту міокарда.

В іншому переважному варіанті здійснення даного винаходу захворювання серця являє собою серцеву недостатність. Серцева недостатність являє собою хворобливий стан, при якому серце нездатне перекачувати кров зі швидкістю, необхідною для нормального метаболізму. Майже при всіх формах серцевої недостатності хвилинний серцевий викид знижений, це пов'язано з меншим кровотоком, який називають артеріальним незаповненням. Організм компенсує, утримуючи рідину у збільшеному об'ємі крові. Серцева недостатність може бути гострою або хронічною. На ранніх стадіях клінічні симптоми серцевої недостатності можуть здаватися односторонніми, але оскільки міжшлуночкова трабекула (перегородка) є спільною для правого і лівого шлуночка, то неминуче, що недостатність одного шлуночка веде до недостатності іншого. Серцева недостатність може бути зв'язана з ішемічною хворобою серця. Вона може бути обумовлена й іншими причинами, такими як системна гіпертензія, порок клапана серця або легеневе захворювання, яке веде до застійної серцевої недостатності.

Серцева недостатність може бути застійною серцевою недостатністю, яка є симптоматичною дисфункцією міокарда, що приводить до розвитку характерного профілю гемодинамічних, ниркових, і нейрогормональних реакцій. Клінічні виявлення серцевої недостатності можуть бути недостатністю лівого шлуночка або недостатністю правого шлуночка. Серцева недостатність виявляється як систолічна або діастолічна дисфункція або як та й інша. Поеднання систолічної та діастолічної аномалій є звичайним.

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу хвороба серця являє собою кардіоміопатію. Кардіоміопатія являє собою будь-яку структурну або функціональну аномалію шлуночка серцевого м'яза.

Термін "профілактика" у контексті даного винаходу відноситься не тільки до загальної профілактики визначеного ефекту, але також і до будь-якої обмеженої або значної профілактики, до ослаблення, пом'якшення, зниження або зменшення ефекту до його виникнення або на ранніх стадіях.

Термін "лікування" у контексті даного винаходу відноситься до будь-якого сприятливого впливу на перебіг захворювання, включаючи ослаблення, пом'якшення, зниження або зменшення розвитку патологічного стану після виникнення захворювання.

Термін "інгібітор IL-18" у контексті даного винаходу відноситься до будь-якого тину молекул, які модулюють продукцію IL-18 і/або діють таким чином, що

продукція IL-18 і/або його дія ослаблюється, пом'якшується, або частково, практично, або повністю попереджається або блокується.

Інгібітор продукції може являти собою будь-яку молекулу, яка негативно впливає на синтез, процесинг або дозрівання IL-18. Інгібітори, що розглядаються відповідно до даного винаходу, можуть являти собою, наприклад, *jsyrgsresrrpH* генної експресії інтерлейкіну IL-18, антисмислові мРНК, які зменшують або запобігають транскрипції мРНК IL-18 або приводять до деградації мРНК, білки, що погіршують правильне укладання або частково або істотно запобігають секреції IL-18, протеази, які розщеплюють IL-18, після того як він був синтезований, інгібітори протеаз, що розщеплюють про-IL-18 з одержанням зрілого IL-18, такі, наприклад, як інгібітори каспази-1 і т.п.

Інгібітор IL-18 може, наприклад, виступати антагоністом IL-18. Антагоністи можуть або зв'язувати, або секвеструвати саму молекулу IL-18 при достатній спорідненості і специфічності, щоб частково або істотно нейтралізувати IL-18 або ділянку(ки) зв'язування IL-18, відповідальні за зв'язування IL-18 з його лігандами (як, наприклад, з його рецепторами). Антагоніст може також інгібувати сигнальний шлях IL-18, який активується у клітинах при зв'язуванні рецептора IL-18.

Інгібітори IL-18 можуть також бути розчинними рецепторами IL-18 або молекулами, які імітують такі рецептори, або агентами, що блокують дані рецептори IL-18, або антитілами проти IL-18, такими як поліклональні або моноклональні

антитіла, або будь-яким іншим агентом або молекулою, що запобігає зв'язуванню IL-18 з його мішенями, зменшуючи або попереджаючи тим самим запуск внутрішньо- або позаклітинних реакцій, опосередковуваних IL-18.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу інгібітор IL-18 вибраний з інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл проти IL-18, антитіл до будь-якої субодиниці рецептора IL-18, інгібіторів сигнального шляху IL-18, антагоністів IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують рецептор IL-18, та білків, що зв'язують IL-18, ізоформ, мутеїну, злитих білків, функціональних похідних, активних фракцій або їх кругових переставних похідних, які інгібують біологічну активність IL-18.

Термін "білки, що зв'язують IL-18", який використовується тут, синонімічний "білку, що зв'язує IL-18" або "IL-18BP". Маються на увазі білки, що зв'язують IL-18, які охарактеризовані у [WO 99/09063 або у Novick і співавт., 1999], які включають сплайсингові варіанти і/або ізоформи білків, що зв'язують IL-18, як вказано у [Кіт і співавт., 2000, які зв'язуються з IL-18. Зокрема, застосовними відповідно до даного винаходу є ізоформи а і с IL-18BP людини. Дані білки, застосовні відповідно до даного винаходу, можуть бути глікозилізованими або неглікозилізованими, вони можуть бути одержані з природних джерел, таких як сеча, або вони можуть бути переважно одержані рекомбінантно. Рекомбінантну експресію можна здійснити у прокаріотичній експресійній системі, аналогічній E.coli, або в еукаріотичній, і переважно - в експресуючих системах ссавців.

Термін "мутеїн", що використовується тут, відноситься до аналогів IL-18BP або до аналогів вірусного IL-18BP, в яких один або декілька амінокислотних залишків природного або вірусного IL-18BP замінюються різними амінокислотними залишками або делегуються або ж один або декілька амінокислотних залишків вбудовуються у послідовність нативного IL-18BP або вірусного IL-18BP без істотної зміни активності одержуваних продуктів у порівнянні з IL-18BP дикого типу або вірусного IL-18BP. Дані мутанти одержують за допомогою відомих методик синтезу і/або сайт-направленого мутагенезу або за допомогою будь-якої іншої відомої методики, придатної для цього.

Відповідно до даного винаходу мутеїни включають в себе білки, що кодуються нуклеїновою кислотою, такою як ДНК або РНК, які гібридизуються з ДНК або РНК, що кодують IL-18BP або кодують вірусний IL-18BP, відповідно до даного винаходу, у жорстких умовах. Термін "жорсткі умови" відноситься до гібридизації і до подальших умов відмивання, які звичайні фахівці у даній області техніки як правило називають "жорсткими". [Див. Ausubel і співавт., Current Protocols in Molecular Biology (Сучасні протоколи у молекулярній біології), вище, Interscience, N.Y., §§6.3 і 6.4 (1987, 1992 і Sambrook і співавт.), вище. Без обмеження, приклади жорстких умов включають в себе умови відмивання 12-20°C нижче розрахункової  $T_m$  даного гібриду при дослідженні, наприклад, в 2xSSC і 0,5% SDS

протягом 5 хвилин, 2xSSC і 0,1% SDS протягом 15 хвилин; 0,1xSSC і 0,5% SDS при 37°C протягом 30-60 хвилин, а потім - 0,1xSSC і 0,5% SDS при 68°C протягом 30-60 хвилин. Звичайним фахівцям у даній області техніки очевидно, що жорсткі умови залежать також від довжини ДНК-послідовностей, олігонуклеотидних зондів (таких як 10-40 основ) або змішаних олігонуклеотидних зондів. При використанні змішаних зондів замість SSC переважно використовувати хлорид тетраметиламонію (TMAC). Див. Ausubel, вище.

Будь-який такий мутеїн переважно володіє амінокислотою послідовністю, яка у достатній мірі повторює послідовність IL-18BP, або послідовністю, яка у достатній мірі повторює послідовність вірусного IL-18BP, такою, що володіє активністю, порівнянною з такою IL-18BP. Одна активність німого IL-18BP полягає у його здатності зв'язувати IL-18. Оскільки даний мутеїн володіє істотною зв'язувальною IL-18 активністю, він може використовуватися для очищення IL-18, як наприклад, за допомогою афінної хроматографії, і, отже, може розглядатися як такий, що володіє істотно подібною активністю до такої IL-18BP. Таким чином, його можна визначити як будь-який даний німий білок, який володіє по суті такою ж активністю, що і IL-18BP, за допомогою звичайного експериментування, яке включає обробку такого німого білка, наприклад, у простому конкурентному 'сендвіч-аналізі, як наприклад, у радіоімунаналізі або ЕІ8А-аналізі, щоб з'ясувати, зв'язується він з відповідним чином позначеним IL-18 чи ні.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу будь-який такий мутеїн володіє, щонайменше, 40%-ю ідентичністю або гомологією з послідовністю IL-18BP або з гомологом IL-18BP, що кодується вірусом, як вказано у [WO 99/09063]. Більш переважно, він володіє, щонайменше, 50%-ю, щонайменше, 60%-ю, щонайменше, 70%-ю, щонайменше, 80%-ю, або 'найбільш переважно, щонайменше, 90%-ю ідентичністю або гомологією з ним.

Мутеїни поліпептидів IL-18BP або мутеїни вірусних IL-18BP, які можна використовувати відповідно до даного винаходу, або нуклеїнова кислота, що кодує їх, включає кінцеву множину, істотно відповідних послідовностей, у вигляді заміщених пептидів або полінуклеотидів, які може одержати звичайним способом будь-який звичайний фахівець у даній області техніки без надмірного експериментування, базуючись на представлених тут вказівках і під їх керівництвом.

Переважними змінами мутеїнів відповідно до даного винаходу є ті, які відомі як "консервативні" заміни. Консервативні амінокислотні заміни у поліпептидах IL-18BP або білках або вірусних IL-18BP, можуть включати синонімічні

амінокислоти, у рамках групи, члени якої володіють досить подібними фізико-хімічними властивостями, щоб обмін членів групи зберігав біологічну функцію даної молекули [Grantham, 1974]. Ясно, що вставки та делеції амінокислот можна також здійснити у згаданих вище послідовностях без зміни їх функції, особливо,

якщо у вставках або делеціях беруть участь лише декілька амінокислот, наприклад, до тридцяти, але переважно до десяти, і не видаляються або не замінюються амінокислоти, які є ключовими для функціональної конформації, наприклад цистеїнові залишки. Білки та мутеїни, одержані за допомогою таких делецій і/або вставок, підпадають під обсяг даного винаходу.

Переважно, синонімічні амінокислотні групи представлені групами, вказаними у Таблиці 1. Більш переважно, синонімічні амінокислотні групи представлені групами, вказаними у Таблиці 2; і найбільш переважно синонімічні амінокислотні групи представлені групами, вказаними у Таблиці 3.

Таблиця 1

Переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gin, Lys, Glu, His
Leu	Lie, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gin, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, He, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
lie	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, He
Phe	Trp, Met, Tyr, He, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, He, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gin, Thr, Arg, His
Gin	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gin
Asn	Gin, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gin, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gin, His, Arg, Glu
Met	Phe, lie, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Таблиця 2

Більш переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, He, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr Ala	Thr Pro, Ala
Val	Val, Met, lie
Gly	Gly
He	lie, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, lie, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser

His	His, Gin, Arg
Gin	Glu, Gin, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gin
Met	Met, Phe, He, Val, Leu
Trp	Trp

Таблиця 3

Найбільш переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, He, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
He	He, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gin	Gin
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, lie, Leu
Trp	Met

Приклади вироблення амінокислотних замін у білках, які можуть використовуватися для одержання мутеїнів поліпептидів IL-18BP або мутеїнів вірусних IL-18BP, для використання у даному винаході, включають стадії будь-яких відомих способів, які представлені у [патентах США 4959314, 4588585 і 4737462 у Mark і співавт.; 5116943 у Koths і співавт.; 4965195 у Namen і співавт.; 4879111 у Chong і співавт. і 5017691 у Lee і співавт.], а заміни лізину у білках представлені у [патенті США №4904584 (Shaw і співавт.)].

Термін "злитий білок" відноситься до поліпептиду, що містить IL-18BP або вірусний IL-18BP або мутеїн або його фрагмент, злитий з іншим білком, який, наприклад, володіє тривалим часом циркуляції у рідинах організму. Тому, IL-18BP або вірусний IL-18BP можна злити з іншим білком, поліпептидом і т.п., наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом.

Термін "функціональні похідні", що використовується тут, включає похідні IL-18BP або вірусного IL-18BP, та їх мутеїни або злиті білки, які можна одержати з функціональних груп, що знаходяться у вигляді бічних ланцюгів у залишках, або з використанням відомих у даній області техніки N- або C-кінцевих груп, включених у даний винахід, оскільки вони залишаються



фармацевтично прийнятними, тобто вони не усувають активність білка, яка практично подібна до активності IL-18BP, або вірусних IL-18BP, і не додають токсичних властивостей композиціям, що містять їх.

Дані похідні можуть, наприклад, включати поліетиленгліколеві бічні ланцюги, які можуть маскувати антигенні ділянки та пролонгувати циркуляцію IL-18BP або вірусного JL-18BP у рідинах організму. Інші похідні включають складні аліфатичні ефіри карбоксильних груп, амідів карбоксильних груп внаслідок взаємодії з аміаком або ж з первинними або вторинними амінами, N-ацильними похідними вільних аміногруп амінокислотних залишків, що утворюються з ацильними складовими (наприклад, алканоліні або карбоциклічні ароїльні групи) або O-ацильними похідними вільних гідроксильних груп (наприклад залишками серилу і треоншу), які утворюються з ацильними складовими.

Як "активні фракції" IL-18BP, або вірусного IL-18BP, мутеїнів або злитих білків даний винахід включає будь-які фрагменти або попередники поліпептидного ланцюга даної білкової молекули, окремо або разом з асоційованими молекулами або залишками, приєднаними до них, наприклад, сахарозними або фосфатними залишками, або з сукупностями білкових молекул або з одними сахарозними залишками, за умови, що вказана фракція володіє практично подібною активністю до IL-18BP.

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу інгібітор IL-18 являє собою антитіло проти IL-18 або його рецептора, IL-18R. Відповідно до даного винаходу можна використовувати антитіла до будь-якої з субодиниць IL-18R, що називаються IL-18Ra і  $\beta$ .

Відповідно до даного винаходу антитіла можуть бути поліклональними або моноклональними, химерними, гуманізованими, або навіть повністю людськими. Рекомбінантні антитіла та їх фрагменти характеризуються високою спорідненістю до зв'язування з IL-18 або IL-18R *in vivo* і низькою токсичністю. Антитіла, які можуть використовуватися у даному винаході, характеризують за їх здатністю лікувати пацієнтів протягом часу, достатнього для досягнення хорошої або повної регресії або полегшення хворобливого стану або симптому або групи симптомів, зв'язаних з хворобливим станом, або за їх низькою токсичністю.

Нейтралізуючі антитіла легко одержати у тварин, таких як кролики, вівці або миші шляхом імунізації препаратами IL-18 або IL-18Ra або  $\beta$ . Імунізовані миші особливо придатні для створення джерела В-клітин при одержанні гібридом, які, у свою чергу, культивують для одержання великих кількостей моноклональних антитіл проти IL-18.

Химерні антитіла являють собою імунoglobulinові молекули, які характеризуються двома або декількома сегментами або частинами, одержаними від різних видів тварин. Як правило, варіабельну ділянку даного химерного антитіла одержують з антитіла відмінного від людини ссавця, такого, наприклад, як, мишаче

моноклональне антитіло, а константну ділянку даного імунoglobulinу одержують з молекули імунoglobulinу людини. Переважно, обидві ділянки та їх поєднання володіють низькою імуногенністю, що визначено звичайним способом (Elliot і співавт., 1994). Гуманізовані антитіла являють собою імунoglobulinові молекули, створювані генноінженерними методами, в яких мишачі константні ділянки замінені людськими аналогами константних ділянок, при збереженні мишачих антиген-зв'язувальних ділянок. Одержане химерне «мишаче-людське» антитіло переважно володіє зниженою імуногенністю і поліпшує фармакокінетику у людей [Knight і співавт., 1993].

Тому у черговому переважному варіанті здійснення даного винаходу антитіло проти IL-18 або проти IL-18R є гуманізованим антитілом. Переважні приклади гуманізованих антитіл проти IL-18 викладені, наприклад, в Європейській Патентній Заявці EP 0 974600.

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу дане антитіло є повністю антитілом людини. Техніка одержання людських антитіл детально описана, наприклад, у [WO 00/76310, WO 99/53049, Патенті США 6162963 або AU 5336100].

Перший спосіб одержання повністю людських антитіл складається з "гуманізації" мишачої гуморальної імунної системи, тобто створення ліній мишей, здатних продукувати людський Ig (ксеногенні миші), шляхом введення локусів людського імунoglobulinу (Ig) мишам, у яких дані ендегенні Ig-гени були інактивовані. Ці Ig-локуси є комплексними з точки зору їх фізичної структури і генної перебудови, і процеси експресії необхідні для одночасного одержання широкої імунної відповіді. Спочатку різноманітність антитіл створюється внаслідок комбінаторної перебудови між різними генами, V, D і J, які присутні у цих Ig-локусах. Дані локуси містять також розкидані регуляторні елементи, які контролюють експресію антитіл, алельне виключення, тип переключення та філогенетичну подібність дозрівання. Введення мишам неперебудованих людських Ig-трансгенів показує, що мишачий механізм рекомбінації порівнянний з генами людини. До того ж, гібридами, які секретують специфічний антиген людських моноклональних антитіл різних ізотипів можна одержати шляхом імунізації антигеном ксеногенних мишей.

Повністю людські антитіла і способи їх створення відомі у даній області техніки [Mendez і співавт. (1997); Buggemann і співавт. (1991); Tomizuka і співавт. (2000) Патент WO 98/24893].

У найбільш переважному варіанті здійснення даного винаходу інгібітор IL-18 являє собою IL-18BP, або ізоформу, німий білок, злитий білок, функціональне похідне, активну фракцію або її змінене кільцеве похідне. Дані ізоформи, мутеїни, злиті білки або функціональні похідні зберігають біологічну активність IL-18BP, зокрема, здатність до зв'язування з IL-18, і переважно володіють, щонайменше, активністю подібною до IL-18BP. Теоретично, такі білки володіють підвищеною

біологічною активністю у порівнянні з немодифікованим IL-18BP.

Переважаючі активні фракції володіють активністю, яка перевищує активність IL-18BP, або володіють додатковими перевагами, такими як підвищена стабільність або ж знижена токсичність або імуногенність, або їх легше одержати у великих кількостях, або легше виділити.

Послідовності IL-18BP та їх сплайсовані варіанти/ізоформи можна запозичити з [WO 99/09063 або від Novick і співавт., 1999, а також у Кіт і співавт., 2000].

Функціональні похідні IL-18BP можуть бути з'єднані з полімерами з метою поліпшення властивостей білка, таких як стабільність, час напівжиття, біологічна активність, переносимість в організмі людини, або імуногенність. Для досягнення цієї мети IL-18BP можна кон'югувати, наприклад, з поліетиленгліколем (PEG). Поліетиленгліколізування можна здійснити за допомогою відомих способів, наприклад описаних у [WO 92/13095].

Тому, у переважному варіанті здійснення даного винаходу інгібітори IL-18 і, особливо, інгібітори IL-18BP, поліетиленгліколізують.

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу інгібітор IL-18 включає в себе білок злиття імуноглобуліну, тобто, інгібітор IL-18 являє собою злитий білок, що включає весь або частину білка, який зв'язує IL-18, що зливається з усім або з частиною імуноглобуліну. Способи створення білків, злитих з імуноглобуліном, добре відомі у даній області техніки, один з них, наприклад, викладений у [WO 01/03737]. Фахівцям у даній області техніки очевидно, що одержання злитого білка даного винаходу зберігає біологічну активність IL-18BP, зокрема, здатність зв'язування з IL-18. Злиття може відбуватися безпосередньо або за допомогою короткого лінкерного пептиду, довжина якого може бути дуже короткою у вигляді 1-3 амінокислотних залишків або більше, наприклад, 13-20 амінокислотних залишків у довжину. Вказаний лінкер може являти собою, наприклад, трипептидну послідовність E-F-M (Glu-Phe-Met), або 13-амінокислотну лінкерну послідовність, що включає Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, яка вводиться між послідовністю IL-18BP та імуноглобуліновою послідовністю. Підсумковий злитий білок володіє поліпшеними властивостями, такими як пролонгований час циркуляції у рідинах організму (час напівжиття), підвищена специфічна активність, підвищений рівень експресії, або більш легке виділення очищенням даного злитого білка.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу IL-18BP злитий з константною ділянкою молекули Ig. Переважно, він злитий з ділянками важкого ланцюга, такими, наприклад, як домени CH2 і CH3 IgG1 людини. Створення специфічних злитих білків, які включають IL-18BP і частину імуноглобуліну, описане, зокрема, у прикладі 11 WO 99/09063. Інші ізоформи молекул Ig також придатні для створення злитих білків відповідно до даного винаходу, такі як IgG<sub>2</sub> або IgG<sub>4</sub>, або інші

класи Ig, такі, зокрема, як IgM або IgA. Злиті білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними.

Ще в одному варіанті здійснення даного винаходу інгібітор IL-18 використовують у поєднанні з антагоністом TNF. Антагоніст TNF виявляє свою активність декількома способами. По-перше, антагоністи можуть зв'язувати або блокувати власне молекулу TNF з достатньою спорідненістю і специфічністю, щоб частково або практично повністю нейтралізувати епітоп TNF або епітопи, відповідальні за зв'язування рецептора TNF (які називаються далі "антагоністи, що блокують"). Антагоніст, що блокує, може, наприклад, являти собою антитіло проти TNF.

Альтернативно, антагоністи TNF можуть інгібувати сигнальний шлях TNF, що активується рецептором клітинної поверхні після зв'язування TNF (які називаються далі "сигнальні антагоністи"). Для терапії або профілактики захворювань серця придатними є обидві групи антагоністів, кожна окремо або разом, у поєднанні з інгібітором IL-18.

Антагоністи TNF легко<sup>1</sup> ідентифікувати і охарактеризувати за допомогою стандартного скринінгу кандидатів за їх впливом на активність нативного TNF у чутливих до нього *in vitro* лініях клітин, наприклад, у лініях В-клітин людини, в яких TNF викликає проліферацію та секрецію імуноглобуліну. Даний аналіз включає композицію TNF з різним розведенням антагоніста-кандидата, наприклад, в 0,1-100 разів від молярної кількості TNF, що використовується у даному аналізі, і контроль без TNF або тільки з антагоністом [Тиссі і співавт., 1992].

Антагоністи, що блокують, є переважними антагоністами TNF, які використовують відповідно до даного винаходу. Серед антагоністів, що блокують, переважними є поліпептиди, які зв'язують TNF з високою спорідненістю і володіють низькою імуногенністю. Молекули розчинного рецептора TNF і нейтралізуючі антитіла до TNF є особливо переважними. Наприклад, у даному винаході використовують розчинні TNF-RI і TNF-RII. Неповні форми цих рецепторів, що включають позаклітинні домени рецепторів або їх функціональні частини, є особливо переважними антагоністами відповідно до даного винаходу. Неповні розчинні рецептори TNF тип I і тип II, описані, наприклад, в [EP 914431].

Неповні форми рецепторів TNF розчинні і детектуються у сечі та сироватці у вигляді 30 кДа і 40 кДа зв'язувальних білків, що інгібують TNF, які називають, відповідно, TNFI і TNFII [Engelmann і співавт., 1990]. Спільне, послідовне або роздільне використання інгібітору IL-18 та антагоніста TNF є переважним відповідно до даного винаходу.

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу розчинний TNF-RI (TBPI) людини являє собою антагоніст TNF, який використовують відповідно до даного винаходу. Нативні та рекомбінантні розчинні молекули рецептора TNF і способи їх одержання були описані в [Європейських Патентах EP 308378, EP 398327 і EP 433900].

Похідні, фрагменти, ділянки і біологічно активні частини рецепторних молекул функціонально подібні до визначених рецепторних молекул, які можна також використовувати у даному винаході. Такий біологічно активний еквівалент або похідне рецепторної молекули відноситься до частини поліпептиду, або до послідовності, що кодує рецепторну молекулу, яка володіє достатнім розміром і здатністю зв'язувати TNF з такою спорідненістю, що взаємодія рецептора TNF, зв'язаного з мембраною, інгібується або блокується.

Інгібітор IL-18 можна використовувати одночасно, послідовно, або роздільно з інгібітором TNF.

Відповідно до даного винаходу даний лікарський засіб може додатково включати відомі агенти, що використовуються при лікуванні захворювань серця, такі як нітрати, наприклад, нітрогліцерин, діуретики, інгібітори FCT, дигіталіс, бета-блокатори, або блокатори кальцієвих каналів, у поєднанні з інгібітором IL-18. Ці активні компоненти можуть використовуватися одночасно, послідовно, або роздільно.

Ще в одному переважному варіанті здійснення даного винаходу інгібітор IL-18 використовують у кількості близько 0,001-100мкг/кг або близько 1-10мг/кг або 2-5мг/кг.

Відповідно до даного винаходу інгібітор IL-18 переважно вводять системно, і переважно підшкірно або внутрішньом'язово.

Крім того, даний винахід відноситься до використання експресуючого вектора, який включає кодуєчу послідовність інгібітору IL-18, для одержання

лікарського засобу, застосовного для профілактики і лікування захворювання серця. Таким чином, розглядається генотерапевтичний метод по доставці інгібітору IL-18 у ділянку, де він необхідний. Для того щоб лікувати і/або попереджувати захворювання серця, генотерапевтичний вектор, що включає послідовність інгібітору IL-18 можна, наприклад, ін'єкувати безпосередньо у дану хвору тканину, уникаючи тим самим труднощів, пов'язаних з системним введенням генотерапевтичних векторів, на зразок розведення цих векторів, що досягають і Жіішенують клітини-мішені або тканини-мішені, і побічних ефектів.

Використання вектора для стимуляції і/або посилення ендogenous утворення інгібітору IL-18 у клітині, яка звичайно не експресує інгібітор IL-18, або експресує недостатню кількість даного інгібітору, також відповідає меті даного винаходу. Вектор може включати регуляторні послідовності, що функціонують у даній клітині, яка передбачає експресу вати інгібітор або IL-18. Такі регуляторні послідовності можуть, наприклад, являти собою промотори або енхансери. Потім дану регуляторну послідовність можна інтродукувати у належний локus даного геному за допомогою гомологічної рекомбінації, приєднуючи таким чином дану регуляторну послідовність до вказаного гена шляхом зшивання, експресію якого необхідно індукувати і посилити. Звичайно дану технологію

називають "Активация ендogenous гена" (EGA), і вона описана, наприклад, у [WO 91/09955].

Фахівцям у даній області техніки потрібно мати на увазі, що експресію IL-18 можна повністю зупинити, без використання інгібітору IL-18, за допомогою одного і того ж методу. Щоб зробити це, у генний локus IL-18 можна ввести, наприклад, негативний регуляторний елемент, наприклад, сайленсер, знижуючи таким чином регуляцію або запобігаючи експресії IL-18. Фахівцям у даній області техніки потрібно мати на увазі, що така знижена регуляція або глушіння експресії IL-18 володіє тим же ефектом, що і використання інгібітору IL-18 з метою профілактики і/або лікування захворювання.

Крім того, даний винахід відноситься до використання клітин, які були генетично модифіковані, для одержання інгібітору IL-18 при виготовленні лікарського засобу, застосовного для лікування і/або профілактики захворювання серця.

Інгібітор IL-18, що використовується відповідно до даного винаходу, можна переважно вводити у вигляді фармацевтичної композиції, необов'язково у поєднанні з терапевтично ефективною кількістю інгібітору TNF.

IL-18BP та його описані вище ізоформи, мутеїни, злиті білки, функціональні похідні, активні фракції або кругові переставні похідні є переважними інгредієнтами фармацевтичних композицій.

Визначення "фармацевтично прийнятний" має на увазі включення будь-якого носія, який не перешкоджає ефективній біологічній діяльності активного компонента, і який не є токсичним для хазяїна, якому він вводиться. Наприклад, для парентерального введення можна приготувати активний(і) білок(и) у вигляді дозованої одиниці для ін'єкції на основі, наприклад, фізіологічного розчину, сироваткового альбуміну або розчину Рінгера.

Активні інгредієнти даної фармацевтичної композиції, відповідно до даного винаходу, можна ввести індивідуально різними способами. Шляхи введення включають внутрішньошкірний, черезшкірний (наприклад, для повільного вивільнення композиції), внутрішньом'язовий, внутрішньочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, внутрішньочерепний, епідуральний, місцевий, та інтраназальні шляхи. Можна використати будь-який інший ефективний шлях введення, наприклад поглинання через епітеліальну або ендотеліальну тканину або генотерапевтичним шляхом, при якому пацієнту вводять ДНК-молекулу (наприклад, за допомогою вектора), яка кодує даний активний агент, що примушує введенний активний агент експресуватися і секретуватися in vivo. Крім того, відповідно до даного винаходу буюк(и) можна вводити разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, таких наприклад, як фармацевтично прийнятні поверхнево-активні речовини, наповнювачі, носії, розріджувачі та засоби доставки.

Для парентерального введення (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного,

внутрішньом'язового) активний білок(и) можна скласти у вигляді розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку з фармацевтично прийнятним парентеральним засобом доставки (наприклад, води, фізіологічного розчину, декстрозного розчину) і з домішками, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стабільність (наприклад, консерванти і буфери). Складену композицію стерилізують за допомогою методів, які звичайно використовуються.

Відповідно до даного винаходу біодоступність активного білка(ів) можна також поліпшити шляхом використання методів приєднання, за допомогою яких підвищують час напівжиття його молекул в організмі людини, приєднуючи, наприклад, дану молекулу до поліетиленгліколю, як описано у [Патентній Заявці PCTWO 92/13095].

Терапевтично активні кількості активного білка(ів) залежать від багатьох змінних, включаючи вид антагоніста, спорідненість антагоніста проти IL-18, і залишкову цитотоксичну активність, яка виявляється даними антагоністами, шлях введення, клінічний стан пацієнта (у тому числі бажана підтримка нетоксичного рівня ендогенної активності IL-18).

"Терапевтично ефективна кількість" складає таку кількість, яка вводиться, що при її введенні інгібітор IL-18 пригнічує біологічну активність IL-18. Доза, що вводиться, для одноразового або багаторазового прийому індивідом варіює у залежності від різних факторів, включаючи фармакокінетичні властивості інгібітору IL-18, шлях введення, стан пацієнта і його дані (стать, вік, маса тіла, життєздатність, об'єм), тривалість симптомів, супровідне лікування, частоту лікування та очікуваний ефект. Узгодження і процедура вибору діапазону доз знаходиться у межах можливостей фахівців у даній області техніки, а також способів *in vitro* та *in vivo*, що визначають ступінь інгібування IL-18 для індивіда.

Відповідно до даного винаходу інгібітор IL-18 використовують у кількості близько 0,001-100мг/кг або близько 0,1-10мг/кг маси тіла, або близько 0,1-5мг/кг маси тіла, або близько 1-3мг/кг маси тіла, або близько 2мг/кг маси тіла.

Шлях введення, який є переважним відповідно до даного винаходу, являє собою підшкірний шлях введення. Відповідно до даного винаходу переважним є також внутрішньом'язове введення. Для того щоб ввести інгібітор IL-18 безпосередньо у визначене місце його дії, його можна також ввести місцево.

В інших додаткових переважних варіантах здійснення даного винаходу інгібітор IL-18 вводять щодня або через день.

Щоденні дози звичайно вказують у вигляді розчленованих доз, для уповільненого вивільнення, що є ефективним для одержання бажаних результатів. Друге або наступне введення можна здійснити у тій же дозі, меншій або більшій від початкового або попереднього введення даному індивіду. Друге або наступне введення можна здійснити під час даного захворювання або перед його початком.

Відповідно до даного винаходу інгібітор IL-18 можна вводити індивіду з профілактичною або терапевтичною метою у терапевтично ефективній кількості до, одночасно або після інших терапевтичних схем або агентів (наприклад, множинних лікарських схем), зокрема, разом з інгібітором TNF і/або іншим кардіозахисним агентом. Активні агенти, які вводять одночасно з іншими терапевтичними агентами можна вводити у складі одних і тих же або різних композицій.

Даний винахід відноситься також до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає змішування ефективної кількості інгібітору IL-18 і/або антагоніста TNF з фармацевтичним прийнятним носієм.

Даний винахід відноситься також до способу лікування захворювання серця, що включає введення пацієнту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості інгібітору IL-18, необов'язково у поєднанні з фармацевтично ефективною кількістю антагоніста TNF.

Тепер, володіючи повним описом даного винаходу, фахівцям у даній області техніки потрібно взяти до уваги, що його можна здійснювати у широкому діапазоні еквівалентних параметрів, вмісту і умов, не виходячи за рамки суті і обсягу даного винаходу і без надмірного експериментування.

Хоча даний винахід описаний у зв'язку зі специфічними варіантами його здійснення, потрібно мати на увазі, що він може бути підданий додатковим модифікаціям. В даній заявці передбачене включення будь-яких змін, призначень або переробок даного винаходу і у тому числі таких відхилень від даної суті винаходу, що знаходяться у межах відомої або звичайної практики, до якої відноситься даний винахід і які можуть бути застосовані до істотних ознак, сформульованих вище, також як і у рамках наведеної нижче формули винаходу.

Всі приведені тут посилання, включаючи журнальні статті і реферати, опубліковані або неопубліковані у патентних заявках США або в іноземних патентних заявках, виданих у США, або в іноземних патентах, або будь-які інші посилання, повністю включені тут шляхом посилання, включаючи всі дані, таблиці, малюнки і текст, представлені у посиланнях, що цитуються. Крім того, повний зміст посилань у рамках посилань, які цитуються тут, також повністю включений шляхом посилання.

Посилання на відомі стадії способу, стадії традиційних способів, на відомі способи або на традиційні способи не є яким-небудь визнанням факту розкриття будь-якого аспекту, опису або варіанту здійснення даного винаходу, повідомленого або підтвердженого у даній області техніки.

Викладений вище опис специфічних варіантів здійснення даного винаходу настільки повно розкриває загальну природу даного винаходу, що інші, застосовуючи знання фахівця у даній області техніки (у тому числі і зміст процитованих тут посилань), можуть легко модифікувати і/або адаптувати різне застосування таких специфічних

варіантів здійснення даного винаходу без надмірного експериментування, не виходячи за рамки основної концепції даного винаходу. Тому мається на увазі, що такі адаптації та модифікації є еквівалентами викладених варіантів здійснення даного винаходу, які базуються на представлених тут вказівках і загальній орієнтації. Потрібно мати на увазі, що формулювання, які використовуються тут, або термінологія призначені для цілей опису і не обмежуються, так що термінологія або формулювання даного опису можуть інтерпретуватися фахівцями у даній області техніки у світлі представлених тут вказівок і загальної орієнтації та відповідно до знань звичайних фахівців у даній області техніки.

#### Приклади

Приклад 1: Інгібування IL-18 зменшує ішемічну дисфункцію міокарда *in vitro*

#### Матеріал і методи Реагенти

Ізоформу IL-18BP експресують з N-кінцевою міткою (His)<sub>6</sub> в оваріальних клітинах китайського хом'ячка і виділяють очищенням до гомогенності. Здатність IL-18BP-(His)<sub>6</sub> нейтралізувати IL-18 була описана (Кіт і співавт., 2000). Інгібітор ICE (ICEi) Ac-Try-Val-Ala-Asp-xnopMeraiiKeTOH (YVAD) одержують від Alexis/ Biochemicals (San Diego) і розчиняють у DMSO до 10 мг/мл. Перед використанням ICEi розбавляють розчином Tyrode's. У моноядерних клітинах периферичної крові людини ICEi зменшує індуковану ендотоксинами секрецію зрілого IL-1 $\beta$  на 92%, що виміряно в ELISA (Cistron Biotechnology, Pine Brook, NJ).

#### Виділення трабекул передсердь

Пацієнти, які піддаються операції вибіркового шунтування коронарної артерії, з використанням насоса-оксигенатора, потребують введення канюлі у праве передсердя. У цей момент звичайним способом вирізають і відкладають невеликий сегмент вушка правого передсердя. З цієї відкладеної тканини одержують трабекули. Тканину передсердь людини поміщають в оксигенований буферний розчин Tyrode's при 4°C. Модифікований розчин Tyrode's готують щодня на деіонізованій дистильованій воді, що містить 5 моль/літр D-глюкози, 2,0 моль/літр CaCl<sub>2</sub>, 118,0 моль/літр NaCl, 4,0 моль/літр KCl, 1,2 моль/літр MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 25 моль/літр NaHCO<sub>3</sub>, і 1Д моль/літр NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Вільний від субстрату розчин Tyrode's містить 7 моль/літр холінхлориду для підтримки осмотичного тиску. Якщо не вказано інакше, хімікалії та реагенти одержують від Sigma. Двічотири трабекули (4-7мм довжиною і <1,0мм у діаметрі) приєднують до динамометричного датчика і занурюють у нагріту (37°C) 30мл термостатовану ванну з модифікованим розчином Tyrode's; під час потюхія проносять у вигляді бульбашок суміш з 92,5% O<sub>2</sub>/7,5% CO<sub>2</sub>. Дана газова суміш створює парціальний тиск O<sub>2</sub>>350 мм рт.ст. (1мм рт.ст.=133Па), парціальний тиск CO<sub>2</sub> 36-40 мм рт.ст., і рН 7,35-7,45. Кожний параметр контролюють звичайним способом за допомогою автоматичного газового аналізатора крові. В експерименті температуру органу у термостатованій ванні підтримують на рівні 37°C.

Під час моделювання ішемії вказану газову суміш перемикають на суміш, що містить 92,5% N<sub>2</sub>/7,5% CO<sub>2</sub>. Дана суміш створює парціальний тиск O<sub>2</sub><50мм рт.ст. Вказаний буферний розчин змінюють кожні 20 хв. за винятком 30 хв. періоду моделювання ішемії.

#### План експерименту

Трабекули зрівноважують протягом 90хв. для збільшення базової шкортності до 1000мг і одержану шкортність стабілізують. Трабекули, шкортність яких складає трохи більше 250мг, виключають з дослідження. Під час 90хв. зрівноважування кардіостимуляцію здійснюють за допомогою платинових електродів (Radnoti Glass, Monrovia, CA) в області стимуляції. Платинові електроди поміщають на будь-яку сторону трабекул, стимулюють (Grass SD9 stimulator, Warwick, RI) 6мс імпульсами при напрузі на 20% вище порогу, і протягом потюхія задають крок в 1Гц, а протягом ішемії - в 3Гц. Шкортнення відстежують

за допомогою динамометричних датчиків (Grass FT03) і реєструють за допомогою комп'ютеризованого передпідсилювача і цифрового датчика (MacLab Quad Bridge, MacLab/8e, AD Instruments, Milford, MA) і безперервно відстежують за допомогою комп'ютера фірми Макінтош.

Після зрівноважування трабекули окремого пацієнта досліджують у трьох експериментальних умовах: контрольні умови включають 90хв. нормальної оксигенації при посиленій перфузії; I/R включає 30хв. модельовану ішемію з подальшою 45хв. реперфузією; і третя умова включає антицитокіновий вплив. В останньому випадку антицитокін додають у термостатовану ванну з посиленою перфузією якраз перед початком ішемії і він присутній протягом 45хв. реперфузії.

#### Збереження активності КК трабекул

По закінченню тканинної реперфузії визначають КК-активність, як описано (Kaplan і співавт., 1993). Тканини гомогенізують у 100 об'ємах крижаного ізотонічного буфера для екстракції (Cleveland і співавт., 1997, Kaplan і співавт., 1993). Даний аналіз здійснюють за допомогою набору для КК (Sigma) з використанням автоматичного спектрофотометра. Результати представлені у вигляді одиниць активності КК на мг (маса сирої тканини).

#### Виділення РНК і зв'язана ревертазна ПЛР

Свіжовиділені трабекули гомогенізують у Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati), а тотальну РНК виділяють за допомогою екстрагування хлороформом і осадження ізопропанолом. Виділену РНК розчиняють у водному діетилпірокарбонаті, обробляють ДНКазою і визначають кількісно з використанням GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech). кДНК-ові способи описані [Reznikov і співавт., 2000]. У кожній ПЛР використовують наступну послідовність операцій: попереднє нагрівання при 95°C протягом 15хв., з подальшими циклами 94°C протягом 40сек., 55°C протягом 45 сек., і 72°C протягом 1 хв., з фазою завершального подовження при 72°C протягом 10хв. Оптимальне

число циклів визначене у кількості 35. Приведені приклади для гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH) і IL-18 людини [Rezников і співавт., 2000], а також для IL-18BP людини [Кіт і співавт., 2000]. Одержані продукти ПЛР розділяють у 1,5%-ному агарозному гелі, що містить 0,5xTBE (50мМ Трис/45мМ борна кислота/0,5мМ EDTA, pH 8,3) та етидйбромід у кількості 0,5мг/мл, візуалізують шляхом опромінення УФ, і фотографують. Денситометрію здійснюють по негативному зображенню (IMAGEQUANT software, Molecular Dynamics), а відносно поглинальну здатність ПЛР-продуктів IL-18 і IL-18BP уточнюють проти поглинання, одержаного для GAPDH.

#### Визначення IL-18

Свіжоодержані трабекули гомогенізують як вказано вище для вимірювання КК. IL-18 аналізують за допомогою рідкофазової хемілюмінесценції (ECL, Igen. Gaithersburg, MD). Мишачі антитіла проти IL-18 людини (R&D Systems) мітять за допомогою рутенію (Igen). Крім того, виділені очищенням по спорідненості козячі антитіла проти IL-18 людини (R&D) мітять біотином (Igen). Одержані біотинільовані антитіла розбавляють до кінцевої концентрації 1мкг/мл у PBS (pH 7,4), що містить 0,25% BSA, 0,5% Твін-20, і 0,01% азиду (ECL-буфер). В аналітичній пробірці при кімнатній температурі преінкубують 25 мкл біотинільованих антитіл з 25мкл покритих стрептавідином парамагнітних намістинок (Dyna, Great Neck, NY) у концентрації 1 мкг/мкл протягом 30хв. при енергійному струшуванні. Зразки (25мкл), що тестуються, або стандарти вносять у пробірку слідом за 25мкл мічених рутенієм антитіл (кінцева концентрація 1 мкг/мкл, розбавлена ECL-буфером). Потім ці пробірки струшують протягом 24год. Дану реакцію заглушують додаванням 200мкл PBS на пробірку і в аналізаторі Origen Analyzer (Igen) кількісно визначають хемілюмінесценцію. Межа виявлення для IL-18 складає 16пкг/мл.

#### Софокальна мікроскопія

Тканину передсердя людини, одержану під час введення канюлі насоса-оксигенатора, поміщають у пластиковий 1 см-вий тримач [Meldrum і співавт., 1998], і заморожують у середовищі для заморожування тканин (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) в ізопентані, що охолоджується сухим льодом. Заморожені зрізи нарізають у кріостаті Leica CM 1850 (Leica, Deerfield, IL). Зрізи на предметних скельцях фіксують протягом 10 хв. у 4%-му параформальдегіді, висушують на повітрі, та інкубують протягом 20 хв. у PBS з додаванням 10% нормальної козячої сироватки крові. Зрізи інкубують у розбавлених 1:100 антитілах проти IL-18 людини (Perotech, Rocky Hill, NJ) або неімунних IgG кролика при концентрації 1мкг/мл як негативний контроль. Ці антитіла розбавляють у PBS, що містить 1% BSA. Після інкубації протягом ночі при 4°C інкубовані зрізи тричі промивають за допомогою 0,5 BSA у PBS. Потім промиті зрізи інкубують у темряві при кімнатній температурі протягом 60 хв. з кон'югованими з Alexa488

(Molecular Probes) вторинними козячими антитілами проти кролячих антитіл. Ядра забарвлюються бісбензімідом (Sigma) при 1 мкг/100 мл у блакитний колір. Після забарвлювання зрізи промивають і переглядають у співфокусній лазерній системі, що сканує, з подальшим аналізом у комп'ютері з використанням програми SLIDEBOOK для комп'ютера Макінтош (Intelligent Imaging Innovations, Denver).

#### Статистичний аналіз

Дані представлені у вигляді середніх  $\pm$  SEM. Середню зміну для зусилля, що розвивається, розраховують відносно контрольного значення протягом 90 хв. для кожної тканини пацієнта. Статистичну значимість відмінностей між групами визначають за допомогою факторного дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим Bonferroni<sup>4</sup>Dunn-aHajiiisoM. Статистичні підрахунки здійснюють за допомогою програми STAT-VIEW 4,51 (Abacus Concepts, Calabasas, CA).

#### Результати

Ефект нейтралізації ендогенного IL-18 та IL-18BP на створення постішемичної скоротності

На Фіг.1А представлена кінетична відповідь трабекул на I/R-пошкодження. Показано завершальне 15хв. зрівноважування і 100%-а нормалізація на початок експериментального періоду. Під час експерименту в умовах нормальної оксигенації контрольні трабекули піддаються посиленій перфузії. Для контрольних трабекул показане зниження (10%) у скоротності. Трабекули, що піддаються ішемії, швидко погіршують скорочувальну функцію; при реперфузії сила скорочення відновлюється, приблизно, на 25% від скоротності, що створюється у контролі. Навпаки, трабекула піддана ішемії, але у присутності IL-18BP, відновлюється на 55% від скоротності, що створюється у контролі. Щоб визначити I/R-відповідь тканин серця від декількох пацієнтів, рівень створення скоротності для контрольних трабекул протягом 90хв. беруть за 100% для кожного зразка пацієнта і розраховують відсоткову зміну для створення скоротності в експериментальних групах.

Як показано на Фіг.1В постішемична скоротність, що створюється, для необроблених трабекул (I/R) знижується, у середньому, на 35% від контролю. Однак у присутності IL-18BP це зниження зменшується, відповідно, у середньому на 66,2% від контролю при 1мкг/мл, і на 76% при 5мкг/мл. Дані результати підтверджують, що I/R приводить до вивільнення біологічно активної IL-18 після процесингу ендогенного попередника IL-18 за допомогою ICE. Тому, IL-18 вимірюють у свіжоодержаній тканині передсердя. Як показано на Фіг.2 у трабекулах, одержаних перед введенням канюлі насоса-оксигенатора у праве передсердя, представлений базисний IL-18. Через 90 хв. зрівноважування, 30 хв. ішемії, і 45 хв. реоксигенації трабекули гомогенізують і визначають рівень IL-18. Відмічено 4,5-разове збільшення IL-18 у даній тканині після I/R (Фіг.2).

У цих тканинах визначають також постійні рівні мРНК для IL-18 і IL-18BP. У свіжоодержаних

гомогенатах передішемичного передсердя спостерігається основна генна експресія IL-18 і IL-18BP (Фіг.3А, В). Поряд з підвищенням рівня IL-18-білка I/R індукує також стійке збільшення рівнів мРНК IL-18 (4,7-разове збільшення). Генна експресія IL-18BP спостерігається також у свіжоодрержаній тканині передсердя і збільшується лише обмежено після I/R (у 1,3 рази).

Виявлення EL-18 в міокарді людини

Оскільки і білок IL-18, що виміряно за допомогою TCL, і мРНК IL-18 присутні у свіжоодрержаних гомогенатах міокарда, для визначення знаходження IL-18 використовують гістохімічне забарвлювання. Тканини передсердя одержують безпосередньо перед введенням канюлі насоса-оксигенатора і зразу миттєво заморожують (не показано). IL-18 спостерігають в осідлих макрофагах міокарда та у судинних ендотеліальних клітинах. IL-18 у макрофагах і в ендотеліальних клітинах присутній перед будь-яким зв'язаним з ішемією процесом за відсутності контакту з будь-якою нужорідною поверхнею. Дані про локалізацію IL-18 в осідлих макрофагах і в ендотеліальних клітинах узгоджуються з попередніми дослідженнями конститутивного заздалегідь створеного попередника IL-18 у свіжоодрержаних периферичних людських моноцитах від здорових пацієнтів [Puren і співавт., 1999]. Тому можна зробити висновок, що заздалегідь створений попередник IL-18 існує у міокарді пацієнта, з ішемічною хворобою серця, якого запланували на коронарне шунтування.

Вплив ICE-інгібування на створювану постішемичну скоротність

Оскільки IL-18BP ефективно ослаблює викликану ішемією дисфункцію міокарда, автори припускають, що інгібування перетворення заздалегідь сформованого попередника IL-18 у зрілий IL-18 буде також ослаблювати викликану ішемією дисфункцію міокарда. Тому, специфічний інгібітор ICE YVAD додають у термостатовану ванну з посиленою перфузією до виникнення ішемії. Інгібування ICE здійснюють шляхом безперервного додавання YVAD у період ішемії і протягом відновлення кровотоку. YVAD-опосередковане інгібування ICE приводить до ослаблення викликаної ішемією дисфункції міокарда, що показано внаслідок поліпшення скорочувальної функції з 35% у контролі для I/R до 60% при 10мкг/мл і 75,8% при 20мкг/мл (Фіг.4). Ці результати підтверджують, що біологічно активний IL-18 у людському міокарді є результатом розщеплення заздалегідь створеного попередника IL-18 за допомогою ICE. Крім того, дані результати підтверджують, що ішемія міокарда може активувати латентний ICE.

Збереження клітинної життєздатності

Внутрішньоклітинні рівні КК використовують для оцінки ступеня клітинної життєздатності після I/R. У даному аналізі найбільшому значенню КК відповідає більша кількість життєздатних клітин. Кожний вплив антицитокіну зберігає клітинну життєздатність. Як показано на Фіг.5, інгібування IL-18BP- та ICE- (10 і 20мкг/мл) підвищує внутрішньоклітинні рівні КК після I/R з 1,399 до,

відповідно, 5,921, 5,675, 6,624, і 4,662 одиниць активності КК на мг (сирої тканини). Ці спостереження підтверджують, що інгібування індукованої I/R активації IL-18 зберігає життєздатність клітин міокарда у даній ex vivo моделі.

Вплив нейтралізації TNFα-індукованої функції міокарда

Як показано на Фіг.6, зусилля (DF), що розвивається, трабекул було знижено на 18% після 90 хвилин впливу екзогенного TNFα. Нейтралізація дії ендогенного IL-18 на скорочувальну функцію людського міокарда, що експонується з екзогенним TNFα, шляхом інкубації з IL-18BP протягом десяти хвилин перед додаванням TNFα, знижує величину ослаблення зусилля (DF), що розвивається, див. Фіг.6. Через 90 хвилин зусилля, що розвивається, у контрольній групі було зменшене на 18%, тоді як для трабекул, експонованих з TNFα, воно зменшилось на 58% у порівнянні з контролем. Однак, для трабекул, експонованих з TNFα і з IL-18BP зусилля, що розвивається, ослабло лише на 30% у порівнянні з контролем. Ці дані підтверджують, що пряма пригнічувальна дія TNFα на скорочувальну здатність міокарда опосередковується, щонайменше частково, біологічно активним ендогенним IL-18.

Вплив екзогенного EL-18 на скоротність, що створюється

Далі визначена пряма дія екзогенного IL-18 на скорочувальну функцію міокарда. IL-18 додають до трабекул при посиленій перфузії після 90 хвилин зрівноважування і при кожній зміні термостатованої ванни. Як показано на Фіг.7, дія IL-18 протягом експериментального періоду веде до повільного, але поступового зниження зусилля, що розвивається. Після 90 хвилин безперервного витримування з IL-18 зусилля, що розвивається, знижується на 42%. Ці дані свідчать, що екзогенний IL-18, подібно до TNFα, діє на міокард як депресант.

Цікаво, що IL-18 не є сильним депресантом міокарда як це властиво TNFα.

Збереження клітинної життєздатності

Каспази часто асоціюються з апоптозом. Щоб оцінити життєздатність клітин трабекул, експонованих у TNFα, вимірюють внутрішньоклітинну КК їх тканини. У даному аналізі високі рівні КК служать ознакою життєздатності клітин. Як зображено на Фіг.8, контрольні трабекули, які протягом 90 хвилин піддаються посиленій перфузії в умовах нормальної оксигенації, містять  $6801 \pm 276$  одиниць активності КК на міліграм маси сирої тканини. На противагу цьому, трабекули, піддані 30/45-хвилинному I/R пошкодженню або 90-хвилинному впливу TNFα виявляють знижені рівні збереженої КК, відповідно,  $3246 \pm 217$  одиниць/мг. Трабекули, витримані з TNFα у присутності IL-18BP, містять  $5605 \pm 212$  одиниць/мг тканини. Цікаво зазначити, що трабекули, оброблені TNFα зберігають більш високі рівні КК у порівнянні з I/R-трабекулами. Це було несподіваною знахідкою, оскільки величина зусилля, що розвивається, у кінці

експериментального періоду виявилася аналогічною для I/R і TNF $\alpha$ .

Приклад 3: IL-18BP захищає від інфаркту міокарда IL-18BP *in vivo* Внутрішньом'язове *in vivo*-електроперенесення мишачої плазміди, яка експресує IL-18.

Мишей C57BL/6 одержують з 3-тижневим інтервалом, ін'єкують 3 рази експресуючою плазмідом, яка містить кДНК IL-18BP (що називається рсДНК-IL-18BP і описана у [WO 01/85201]). Контрольних мишей ін'єкують контрольною пустою плазмідом. Мишачу ізоформу IL-18BP кДНК, виділену як описано (допоміжний номер # Q9ZOM9) [Kim і співавт., 2000], субклонують в EcoRI/NotI-сайт експресуючого вектора, рсДНК3 клітини ссавця під контролем , цитомегаловірусного промотору (Invtrogen). Контрольна плазміда була аналогічної конструкції за винятком терапевтичної кДНК. Контрольна група містила 31 мишу, а експериментальна група, яка одержує IL-18BP, включала 27 мишей.

Контрольну експресійну плазмідом, або експресійну плазмідом з IL-18BP, (60 мкг), ін'єкують і у великогомілковий, і у черепний м'яз анестезованих мишей, як описано раніше [Mallat і співавт., 1999]. Коротко, черезшкірні електричні імпульси (8 прямокутних імпульсів 200 В/см, тривалістю 20мс при 2Гц) видаються за допомогою мультівібратора PS-15 (Genetronic, France) і з використанням двох електродів у вигляді пластин з нержавіючої сталі на відстані одна від одної 4,2-5,3мм з кожної сторони лапки.

Індукція інфаркту у лівому шлуночку

Через двадцять чотири години після введення плазміди IL-18BP або пустої плазміди, мишей анестезують за допомогою IP-ін'єкції ксилазину або кетаміну, підключають до зовнішнього дихання і піддають торакотомії. Використовуючи 8-0 пролен (довгий) шовний матеріал, надовго перев'язують ліву магістральну коронарну артерію з тим, щоб викликати інфаркт міокарда, після чого закривають грудну клітку і тварин залишають прокинутися від анестезії. Загибель під час операції складає менше 20%. Післяопераційна загибель досягає 48% у контрольній групі і 26% - в експериментальній групі, яка трапляється майже виключно через 4-5 днів після перев'язки судини.

Через сім днів після лігування мишей повторно анестезують і за допомогою електрокардіографії визначають об'єм лівого шлуночка (LV) у закритій грудній клітці, використовуючи для цього електрокардіограф ATL HDI 5000. Дробне укорочення LV розраховують за вимірюванням поперечника у кінці діастолі та у кінці систолі. По закінченню електрокардіографічного вимірювання серце витягують, фіксують, після чого роблять зрізи. Потім гістологічні зрізи забарвлюють за допомогою сиріусу червоного для визначення розміру інфаркту.

Результати

У мишей, що вижили, діастолічний поперечник лівого шлуночка після семи днів накладення лігатури виявився наступним:

0,53±0,01мм (n=20) у мишей, оброблених за допомогою IL-18BP проти 0,59±0,01 у контрольних мишей (n+16), p<0,01.

У мишей, що вижили, систолічний поперечник лівого шлуночка після семи днів накладення лігатури виявився наступним:

0,45±0,02 у мишей, оброблених за допомогою IL-18BP проти 0,52±0,02 у контрольних мишей, p<0,01.

Дробне укорочення лівого шлуночка: 15±1% у мишей, оброблених за допомогою IL-18BP проти 11±1% у контрольних мишей, p<0,01.

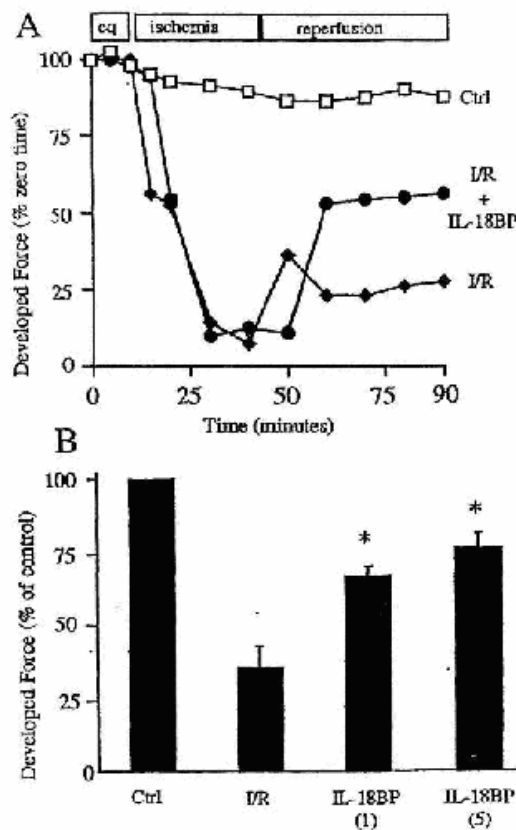
Висновок: IL-18BP знижує смертність серед мишей після інфаркту міокарда, викликаного повним коронарним лігуванням лівого шлуночка, на 50%. Крім цього, функція лівого шлуночка істотно поліпшується, як показано по зменшеному систолічному і діастолічному поперечнику даного лівого шлуночка.

Посилання:

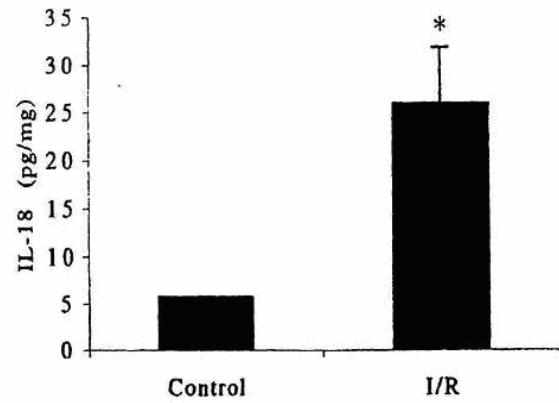
1. Bolli, R. (1990) *Circulation* 82, 723-38.
2. Buggemann et al., *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1328 (1991)
3. Cain, B. S., Meldrum, D. R., Dinarello, C. A., Meng, X., Banerjee, A. & Harkan, A. H. (1998) *J Surg Res* 78, 117-23.
4. Cleveland, J. C. J., Meldrum, D. R., Cain, B. S., Banerjee, A. & Harkan, A. H. (1997) *Circulation* 96, 29-32.
5. Daemen MA, van't Veer C, Wolfs TG, et al: Ischemi/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL- 12 and IL-18. *J Immunol.* 162:5508-5510, 1999
6. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. and Karin, M. (1997). *Nature* 388, 16514-16517.
7. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bjell, H., and Woody, J.N., 1994, *Lancet* 344, 1125-1127.
8. Engelmann, H., Novick, D., and Wallach, D., 1990, *J.Biol.Chem.* 265, 1531-1536.
9. Fantuzzi, G., A. J. Puren M. W. Harding, D. J. Livingston, and C. A. Dinarello. *Blood* 91: 2118-25, 1998.
10. Grantham (1974), *Science*, 185, 882-884.
11. Gurevich, J., Frokda, I., Yunes, Y., Paz, Y., Maiss, M., Mohr, R. & Yakovlev, V. (1996) *J Am Coll Cardiol* 28, 247-52.
12. Herskowitz, A., Choi, S., Ansari, A. A. & Wesselingh, S. (1995) *Am J Pathol* 146, 13.
13. Hochholzer, G., G. B. Lipford, H. Wagner, K. Pfeiffer, and K. Heeg. *Infect Immun.* 68: 3502
14. Kaplan, L. J., Blum, H., Banerjee, A. & Whitman, G. J. (1993) *J Surg Res* 54, 31 1-5.
15. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1190-1195.



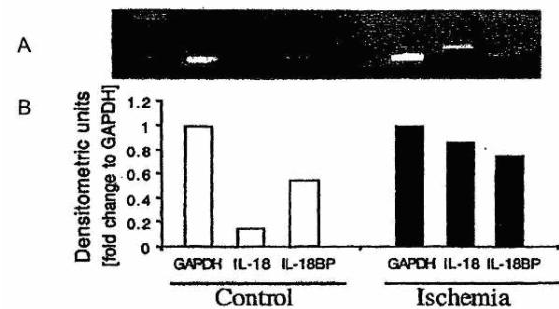
16. Kim SH et al., *J. Immuno.* 2001, 166, pp. 148 – 154.
17. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moor MA, Vilek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993 Nov 30;30:16 1443-53
18. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
19. Meldrum, D. R., Cleveland, J. C., Jr., Cain, B. S., Meng, X. & Harken, A. H. (1998) *Ann Thorac Surg* 65, 439-43.
20. Mendez, M.M., Green, L.L., Corvalan, J.R.F., Jia X-C., Maynard-Curtis, E.E., Yang, X-D., Gello, 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.
21. Nakamura, K, Okamura, H, Nagata, K and Tamura, T. (1989). *Infect. Immun.* 57, 590-595.
22. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M (1999). *Immunity* 10, 127-136.
23. Parnet, P, Garica, K E, Bonneret, T P, Dower, S K, and Sims, J E. (1996). *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.
24. Puren, A. J. , Fantuzzi, G. & Dinarello, C. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2256-2261
25. Raeburn, C. D., C. M' Calkins, M. A. Zimmerman, Y. Song, L. Ao, A. Banerjee, X. kang, and A. H. Harken. *Surgery* 130: 319-25., 2001.
26. Reznikov, L. L., Kim, S. H., Westcott, J. Y., Frishman, J., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstein, M. & Dinarello, C. A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2174-2179.
27. Torigoe, K., Ushio, S., Ohtsuka, T., Kobayashi, S., Tanaka, M., Kurikake, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fujii, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H. & Kurimoto, M. (1997) *J Biol Chem* 272, 25737-25742.
28. Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 (2000)
29. Tuod, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayor, J.M., and Zubler, R.H., 1992. *J. Immunol.* 148, 2778-2784.
30. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, K (1998). *J. Immunol.* 161, 3400-3407.



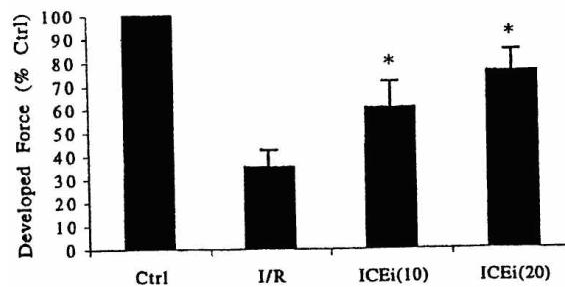
Φir.1



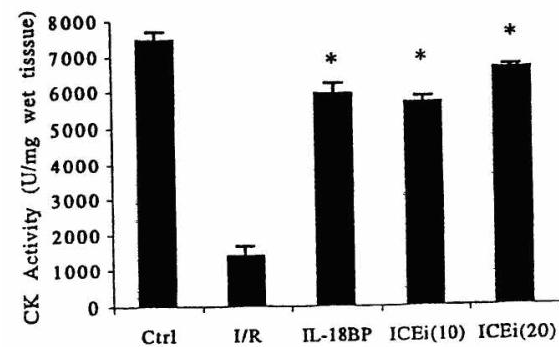
Φir.2



Φir.3



Φir.4



Φir.5

