



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 85531

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 39/395

A61K 38/00

A61K 48/00

C12N 15/85

A61P 31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ IL-18 ІНГІБІТОРІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АБО ПОПЕРЕДЖЕННЯ ПОВ'ЯЗАНОЇ З СЕПСИСОМ ДИСФУНКЦІЇ СЕРЦЯ

1

2

(21) 20031211613

(22) 16.05.2002

(24) 10.02.2009

(86) PCT/US02/15556, 16.05.2002

(31) 60/291,463

(32) 16.05.2001

(33) US

(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.

(72) ДІНАРЕЛЛО ЧАРЛЬЗ А., ФАНТУЦЦИ ДЖАМІ-  
ЛА, КІМ СОО-ХІУН, РЄЗНІКОВ ЛЕОНІД, РУБІНШ-  
ТЕЙН МЕНАХЕМ, НОВІК ДАНІЕЛА, ШВАРЦБУРД  
БОРИС

(73) ЙЄДАРІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КО. ЛТД.

(56) EP 0974600 A2, 26.01.2000.

US 6054487, 25.04.2000.

US 6083981, 04.07.2000.

(57) 1. Застосування інгібітору IL-18 для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики пов'язаної із сепсисом дисфункції серця, де інгібітор IL-18 вибраний з групи: антитіла проти IL-18, антитіла проти зв'язувальних білків IL-18 ВРa і IL-18 ВРc.

2. Застосування за п. 1, де IL-18-зв'язувальний білок є ПЕГ-кон'югованим.

3. Застосування за п. 1, де інгібітор IL-18 є специфічним антитілом проти IL-18, вибраним з групи: химерне, гуманізоване або людське антитіло.

4. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де лікарський засіб додатково містить інгібітор цитокіну, вибраний з групи: фактор некрозу пухлини  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) і IL-1 $\beta$ .

5. Застосування за п. 4 для одночасного, послідовного або роздільного введення.

6. Застосування за п. 4, де інгібітор TNF є розчинною частиною TNFRI або TNFRII.

7. Застосування за п. 4, де інгібітор IL-1 $\beta$  є агоністом рецептора IL-1.

8. Застосування експресуючого вектора, що містить кодуючу послідовність інгібітору IL-18, вибраного з групи: антитіла проти IL-18, антитіла проти зв'язувальних білків IL-18 ВРa і IL-18, для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики пов'язаної з сепсисом дисфункції серця.

9. Застосування експресуючого вектора за п. 8 для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики пов'язаної із сепсисом дисфункції серця шляхом генної терапії.

10. Застосування вектора для індукції і/або посилення ендогенної продукції інгібітору IL-18, вибраного з групи: зв'язувальні білки IL-18 ВРa і IL-18 ВРc у клітині, для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики пов'язаної з сепсисом дисфункції серця.

11. Застосування клітини, яка була генетично модифікована для продукування інгібітору IL-18, вибраного з групи: антитіла проти IL-18, антитіла проти IL-18-зв'язувальних білків IL-18 ВРa і IL-18 ВРc, для отримання лікарського засобу для лікування і/або профілактики пов'язаної із сепсисом дисфункції серця

Дана заявка заявляє перевагу Попередньої заявки США за номером 60/291463, поданої 16 травня 2001 року, опис якої включений тут як посилання.

Даний винахід відноситься до застосування інгібіторів IL-18 для лікування і/або попередження сепсису.

У 1989 році був виявлений фактор, що індукється у сироватці з мишей, інфікованих *Mycobacterium bovis* і стимульованих LPS. Цей фактор був

(13) C2

(11) 85531

(19) UA

здатний індукувати інтерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) у культурах клітин селезінки нормальних мишей у присутності інтерлейкіну-2 (IL-2) (Nakamura et al., 1989). Даний фактор діяв не як прямий індуктор IFN- $\gamma$ , а скоріше як коштимулятор разом з IL-2, анти-CD3 або мітогенами. У спробі додаткової ідентифікації цієї активності з сироватки мишей після обробки ендотоксином був виявлений, очевидно, гомогенний білок з М.м. 50-55 кДа, який був зв'язаний із зазначеною вище активністю (Nakamura et al. 1993). Оскільки інші цитокіни можуть діяти як коштимулятори відносно продукування IFN- $\gamma$ , нездатність нейтралізуючих антитіл до IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 або TNF блокувати цю сироваткову активність припускала, що даний фактор був фактором, який відрізняється. Ті ж самі автори документували, що коштимулятор продукування IFN- $\gamma$ , який індукується ендотоксином, був присутнім в екстрактах печінок з мишей, заздалегідь підданих впливу *P. acnes* (Okamura et al. 1995). Відповідно до цієї експериментальної моделі, популяція печінкових макрофагів (клітин Купфера) збільшується, і, отже, низька доза бактеріального ліпополісахариду (LPS) стає летальною. Подібна обробка не є летальною для невідготованих описаним вище способом мишей. Даний фактор, названий IFN- $\gamma$ -індукуючим фактором (IGIF) і пізніше названим інтерлейкіном-18 (IL-18), був очищений до гомогенності з цих оброблених *P. acnes* печінок мишей, і була одержана часткова амінокислотна послідовність. Для клонування кДНК мишачого IL-18 використовували вивроджені олігонуклеотиди, одержані з амінокислотних послідовностей очищеного IL-18 (Okamura et al. 1995). Людська кДНК-2 послідовність для IL-18 була повідомлена у 1996 році (Ushio et al. 1996).

Інтерлейкін IL-18 (Tsutsui et al. 1996, Nakamura et al. 1993, Okamura et al. 1995, Ushio et al. 1996) має спільні структурні ознаки з сімейством IL-1 білків (Bazan et al. 1996), які всі мають  $\beta$ -складчасту структуру на відміну від більшості інших цитокінів, які виявляють структуру чотириспиральних пучків. Подібно до IL-1 $\beta$ , IL-18 синтезується у вигляді біологічно неактивного попередника (проIL-18) і позбавлений сигнального пептиду (Ushio et al. 1996). Попередники IL-1 $\beta$  та IL-18 розщеплюються каспазою 1 (IL-1 $\beta$ -конвертуючим ферментом або ICE), яка розщеплює дані попередники після залишку аспарагінової кислоти у положенні P1. Одержані зрілі цитокіни вивільняються з клітини (Ghayur et al. 1997 і Gu et al. 1997), незважаючи на відсутність сигнального пептиду.

Відомо, що IL-18 діє як коштимулятор відносно продукування цитокінів (IFN- $\gamma$ , IL-2 і гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора) Т-хелперними клітинами типу I (Th1) (Kohn et al. 1997), а також як коштимулятор відносно FAS-лігандопосередкованої цитотоксичності, що виявляється клонами мишачих природних клітин-кілерів (Tsutsui et al. 1996).

Інтерлейкін-12 (IL-12) є імунорегуляторним цитокіном, що продукується моноцитами/макрофагами та іншими антигенпрезентуючими клітинами. Він є центральним в «оркестровці» як природних, так і набутих клітинно-

опосередкованих імунних відповідей (Trinchieri 1998). Він складається з гетеродимеру, складеного з ковалентно зв'язаних продуктів двох окремих генів: важкого ланцюга (p40) і легкого ланцюга (p35). Продукування IL-12 стимулюється у відповідь на певні бактерії, бактеріальні продукти, внутрішньоклітинні паразити і віруси. IL-12 були приписані наступні функції: 1) він є сильнодіючим індуктором IFN- $\gamma$  з Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK-клітин), 2) він є ко-мітогеном для таких клітин, 3) він є вирішальним для розвитку Th1-реакцій у більшості систем (таким чином, приводячи повторно до збільшень продукування IFN- $\gamma$  і TNF, активації макрофагів і т.д.), 4) він посилює цитотоксичність цитотоксичних Т-лімфоцитів і NK-клітин, і 5) він є необхідним для гіперчутливості уповільненого типу. Було показано, що продукування IL-12 у виділених мишачих лейкоцитах селезінки, оброблених штамом *Staphylococcus aureus* Cowan 1, пригнічується IFN- $\alpha$  або IFN- $\beta$  (Karp et al. 2000).

Нещодавно повідомлялося, що IL-12 бере участь у патогенезі органоспецифічних аутоімунних запальних захворювань, таких як розсіяний (мнотжинний) склероз (MS) (Karp et al. 2000) і запальне захворювання кишечника (IBD) (Blumberg and Strober 2001 і Fiocchi 1999), і, отже, вважається потенційною мішенню лікарських засобів для лікування даних станів.

IL-18 і IL-12 виявляють явний синергізм в індукції IFN- $\gamma$  в Т-клітинах (Okamura et al. 1998). Дослідження механізму цього синергізму виявили, що IL-12 підвищуючим чином регулює експресію обох ланцюгів рецептора IL-18 на продукуючих IFN- $\gamma$  клітинах (Kim et al. 2001). Хоча IL-12 та IL-18 активують як природний, так і набутий імунітет, їх надмірне продукування активованими макрофагами може індукувати порушення великої кількості органів, у тому числі порушення функції імунної системи (Seki et al. 2000).

Цитокінзв'язувальні білки (розчинні рецептори цитокінів) є звичайно позаклітинними лігандзв'язувальними доменами їх відповідних рецепторів цитокінів клітинної поверхні. Вони продукуються або альтернативним сплайсингом, або протеолітичним розщепленням рецептора клітинної поверхні. Ці розчинні рецептори були описані у минулому: наприклад, розчинні рецептори для IL-6 та IFN- $\gamma$  (Novick et al. 1989), TNF (Engelmann et al. 1989 і Engelmann et al. 1990), IL-1 та IL-4 (Maliszewski et al. 1990) і IFN- $\alpha/\beta$  (Novick et al. 1994, Novick et al. 1992). Один цитокінзв'язувальний білок, названий остеопротегерином (OPG, відомий також як фактор, що інгібує остеокласти, - OCIF), член TNFR/Fas-сімейства, є, очевидно, першим прикладом розчинного рецептора, який існує тільки у вигляді білка, що секретується (Anderson et al. 1997, Simonet et al. 1997, Yasuda et al. 1998).

Інтерлейкін-18-зв'язувальний білок (IL-18BP) був афінно очищений на IL-18-колонці з сечі (Novick et al. 1999). IL-18BP припиняє IL-18-індукцію IFN- $\gamma$  та IL-18-активацію NF- $\kappa$ B in vitro. Крім того, IL-18BP інгібує індукцію IFN- $\gamma$  у мишах, ін'єктованих LPS. Ген IL-18BP локалізований у хромосомі 11 людини, і у геномній послідовності розміром 8,3

т.п.н., що містить ген IL-18BP, не був знайдений екзон, що кодує трансмембранний домен. До нашого часу у людини були виявлені чотири ізоформи IL-18BP, що генеруються альтернативним сплайсингом мРНК. Вони були названі IL-18BP a, b, c і d, причому всі вони мають один і той же N-кінець і відрізняються по C-кінцю (Novick et al. 1999). Дані ізоформи відрізняються за їх здатністю зв'язувати IL-18 (Kim et al. 2000). Відомо, що з цих чотирьох ізоформ ізоформи a і c IL-18BP людини (ML-18BP) мають нейтралізуючу активність відносно IL-18. Найбільш представлена ізоформа IL-18BP, ізоформа a сплайсингового варіанта, виявляє високу афінність відносно IL-18 з високою швидкістю зв'язування і низькою швидкістю дисоціації та константою дисоціації ( $K_d$ ), яка складає приблизно 0,4 нМ (Kim et al. 2000). IL-18BP конститутивно експресується у селезінці і належить до суперсемеїства імуноглобулінів. Залишки, що беруть участь у взаємодії IL-18 з IL-18BP, були описані з використанням комп'ютерного моделювання (Kim et al. 2000) і на основі взаємодії між подібним білком IL-1 $\beta$  та IL-1R типу I (Vigers et al. 1997). Відповідно до цієї моделі зв'язування IL-18 з IL-18BP, було зроблене припущення, що залишок Glu у положенні 42 і залишок Lys у положенні 89 IL-18 зв'язуються з Lys-130 і Glu-114 в IL-18BP, відповідно (Kim et al. 2000).

IL-18BP конститутивно присутній у багатьох клітинах (Pugen et al. 1999) і циркулює у кровотоці здорових людей (Urushihara et al. 2000), представляючи унікальний феномен у біології цитокінів. Внаслідок високої афінності IL-18BP відносно IL-18 ( $K_d = 0,4$  нМ), а також високої концентрації IL-18BP, виявленої у кровотоці (20-разового молярного надлишку відносно IL-18), було зроблене припущення, що більшість молекул, якщо не всі молекули, IL-18 у кровотоці є зв'язаними з IL-18BP. Таким чином, циркулюючий IL-18BP, який конкурує з рецепторами клітинної поверхні за IL-18, може діяти як природна протизапальна та імуносупресивна молекула.

Як згадувалося, IL-18 індує IFN- $\gamma$ , який, у свою чергу, як повідомлялося нещодавно, індує генерування мРНК IL-18BPa *in vitro* (Muhl et al. 2000). Таким чином, IL-18BPa міг би служити як сигнал «вимкнення», що термінує запальну реакцію.

IL-18BP є значимо гомологічним з сімейством білків, що кодується декількома поксвірусами (Novick et al. 1999, Xiang and Moss 1999). Інгібування IL-18 цим припустимим вірусним IL-18BP може атенувати запальну антивірусну Th1-реакцію.

Термін синдром системної запальної реакції (SIRS) описує звичайний клінічний синдром сепсису, незалежно від його причини. SIRS може бути результатом травми, панкреатиту, реакцій на лікарські засоби, автоімунного захворювання та інших порушень; коли даний синдром виникає у відповідь на інфекцію, кажуть про присутність сепсису (Nathens and Marshall 1996).

Септичний шок є поширеною причиною смерті у медичних і хірургічних відділеннях інтенсивної терапії (Astiz and Rackow 1998). Терміни сепсис, важкий сепсис і септичний шок використовуються

для ідентифікації розгортання клінічної реакції на інфекцію. Пацієнти з сепсисом виявляють ознаки інфекції та клінічних маніфестацій запалення. Пацієнти з важким сепсисом розвивають гіперфузію з дисфункцією органів. Септичний шок виявляється гіперфузією та стійкою гіпотензією. Смертність знаходиться у діапазоні від 16% у пацієнтів з сепсисом до 40-60% у пацієнтів з септичним шоком. Найбільш звичайною причиною септичного шоку є бактеріальна інфекція. Найбільш частими місцями інфекції є легені, черевна порожнина і сечові шляхи. Звичайні протизапальні терапії, такі як застосування кортикостероїдів, не змогли показати поліпшення у виживанні від сепсису і септичного шоку. Три моноклональних антитіл, специфічних відносно ендотоксину, випробовували у клінічних випробуваннях, і вони не змогли поліпшити коефіцієнти виживаності. Терапія з використанням антагоністів до фактора некрозу пухлини, інтерлейкіну 1, брадикиніну, ібупрофену; та фактора, що активує тромбоцити, не виявляла поліпшення виживання від септичного шоку (Astiz and Rackow 1998).

Сепсис викликається *inter alia* грампозитивними бактеріями, наприклад, *Staphylococcus epidermidis*. Вважається, що ліпотьейхоеві кислоти і пептидоглікани, які є основними компонентами клітинної стінки видів *Staphylococcus*, є індукторами вивільнення цитокінів у даному стані (Grupta et al. 1996 і Cleveland et al. 1996). Однак інші грампозитивні компоненти також розглядаються як стимулятори синтезу цитокінів (Henderson et al. 1996). Вважається, що продукування IL-1, TNF- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  вносить основний внесок у патогенез септичного шоку (Dinarello 1996 і Okusawa et al. 1988). Крім того, було показано, що хемокин IL-8 індується нейтрофілами у відповідь на *S. epidermidis* (Hachicha et al. 1998). Важливими факторами у регуляції індукції IL-1, TNF- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  *S. epidermidis* є IL-18, IL-12, IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$ . IL-1  $\beta$  і TNF- $\alpha$  можуть розглядатися як кофактори для продукування IFN- $\gamma$  Т-лімфоцитами, подібно до IL-18. Дані два цитокіни мають кофакторну активність на продукування IFN- $\gamma$  у контексті IL-12 або бактеріальної стимуляції (Skeen et al. 1995 і Tripp et al. 1993).

Нещодавно Nakamura et al. (2000) повідомили, що одночасне введення IL-18 та IL-12 мишам приводить до високої токсичності, подібно до токсичності, виявленої в індукованому ендотоксинам септичному шоку.

Було показано, що рівні IL-18 підвищуються у сироватках пацієнтів з сепсисом (Endo et al. 2000), але це збільшення корелювало з рівнями креатиніну, що дозволяє припускати, що підвищені рівні IL-18 можуть бути результатом ниркової недостатності. В іншому дослідженні (Grobmeyer et al. 2000) рівні IL-18 у 9 суб'єктів з сепсисом під час перших 96 годин після госпіталізації були високими і не корелювали з рівнями креатиніну.

Як видно із зазначеного вище, IL-18 є плейотропним інтерлейкіном, що має як посилюючу, так і послаблюючу запалення функції. З одного боку, він посилює продукування прозапальних цитокінів, подібних до TNF- $\alpha$ , посилюючи таким чином запалення. З іншого боку, він індує продукування

оксида азоту (NO), інгібітору каспази-1, блокуючи таким чином дозрівання IL-1 $\beta$  і, можливо, послаблюючи запалення. Ця двозначна роль IL-18 піддає сумніву ефективність інгібіторів IL-18 у лікуванні запальних захворювань.<sup>4</sup> Крім того, внаслідок участі великої різноманітності різних цитокінів і хемокінів у регуляції запалення, не можна завжди чекати одержання сприятливого ефекту блокуванням тільки одного з шляхів у настільки складній мережі взаємодій.

Netea et al. (2000) повідомляли, що введення поліклонального антитіла проти IL-18 захищало мишей проти шкідливих дій LPS, які походять як з *E. coli*, так і з перевірених видів *S. typhimurium*, підтверджуючи концепцію, що IL-18 грає важливу патогенну роль у летальному ендотоксикозі. Однак, незвичайність відносно ефективності потенційної композиції для лікування на основі введення інгібіторів IL-18 виявляється у тому, що миші з нокаутом IL-18 не є менш чутливими до сепсису у порівнянні з тваринами дикого типу (Sakao et al. 1999), і у тому, що нещодавні повідомлення припускають, що прозапальна активність IL-18 є істотною для захисної системи хазяїна проти важких інфекцій (Nakanishi et al. 2001 i Fosset al. 2001).

Таким чином, існує необхідність у забезпеченні засобу для лікування і/або попередження сепсису, незважаючи на зазначені вище міркування, які стосуються застосування інгібіторів IL-18.

Даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18 у приготуванні лікарського засобу для лікування і/або попередження сепсису та інших захворювань, характерних для синдрому системної запальної реакції (SIRS), вибраних з тяжкого сепсису і септичного шоку, а також зв'язаного з сепсисом порушення функції серця.

Більш конкретно, даний винахід відноситься до застосування інгібітору IL-18, вибраного з інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл проти IL-18, антитіл проти будь-якої з субодиниць рецептора IL-18, інгібіторів шляху передачі сигналу за участю IL-18, антагоністів IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують IL-18-рецептор, інгібіторів продукування IL-18 та IL-18-зв'язувальних білків, їх ізоформ, мутеїнів, злитих білків, функціональних похідних, активних фракцій або похідних циркулярної перестановки, які мають щонайменше по суті ту ж саму активність, що і IL-18-зв'язувальний білок.

IL-18-зв'язувальний білок, що використовується відповідно до даного винаходу, є його ізоформою, мутеїном, злитим білком (наприклад, Ig-злитим), функціональним похідним (наприклад, ПЕГ-кон'югованим), активною фракцією або похідним циркулярної перестановки.

Антитіла, що використовуються відповідно до даного винаходу, можуть бути специфічними антитілами проти IL-18, вибраними з химерних, гуманізованих і людських антитіл.

Крім того, даний винахід відноситься до застосування інгібітору у приготуванні лікарського засобу, що додатково містить інгібітор IL-12, переважно нейтралізуюче IL-12 антитіло, інтерферон, переважно інтерферон  $\alpha$  або  $\beta$ , інгібітор фактора некрозу пухлини, переважно розчинний TNFRI або TNFRII, і/або інгібітор IL-1, переважно антагоніст

рецептора IL-1, для одночасного, послідовного або роздільного введення.

В одному аспекті даний винахід забезпечує застосування експресуючого вектора, що містить кодуючу послідовність інгібітору IL-18, вибраного з інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл проти IL-18, антитіл проти будь-якої з субодиниць рецептора IL-18, інгібіторів шляху передачі сигналу за участю IL-18, антагоністів IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують IL-18-рецептор, інгібіторів продукування IL-18 та IL-18-зв'язувальних білків, їх ізоформ, мутеїнів, злитих білків або похідних циркулярної перестановки, які мають щонайменше по суті ту ж саму активність, що і IL-18-зв'язувальний білок, у приготуванні лікарського засобу для лікування і/або попередження сепсису, наприклад, за допомогою генотерапії.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує застосування вектора для індукції і/або посилення ендогенної продукції інгібітору IL-18 у клітині у приготуванні лікарського засобу для лікування і/або попередження сепсису.

Крім того, даний винахід забезпечує застосування клітини, яка була генетично модифікована для продукування інгібітору IL-18, у приготуванні лікарського засобу для лікування і/або попередження сепсису.

В іншому варіанті, даний винахід відноситься до способу лікування і/або попередження сепсису та інших захворювань, характерних для синдрому системної запальної реакції (SIRS), у тому числі зв'язаної з сепсисом дисфункції серця, що передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості інгібітору IL-18, вибраного з інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл проти IL-18, антитіл проти будь-якої з субодиниць рецептора IL-18, інгібіторів шляху передачі сигналу за участю IL-18, антагоністів IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують IL-18-рецептор, інгібіторів продукування IL-18 та IL-18-зв'язувальних білків, їх ізоформ, мутеїнів, злитих білків, функціональних похідних, активних фракцій або похідних циркулярної перестановки, які мають щонайменше по суті ту ж саму активність, що і IL-18-зв'язувальний білок. Даний спосіб може передбачати спільне введення терапевтично ефективної кількості інгібітору цитокінів, вибраного з інгібітору IL-12, переважно нейтралізуючих антитіл, інгібіторів фактора некрозу пухлини, переважно розчинної частини TNFRI або TNFRII, інгібіторів IL-1, переважно антагоністів рецептора IL-1, та інгібіторів IL-8, і/або інтерферону, переважно інтерферону- $\alpha$  або - $\beta$ .

Крім того, даний винахід забезпечує спосіб лікування і/або попередження сепсису та інших захворювань, характерних для синдрому системної запальної реакції (SIRS), що передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості вектора, що кодує послідовність інгібітору IL-18, вибраного з інгібіторів каспази-1 (ICE), антитіл проти IL-18, антитіл проти будь-якої з субодиниць рецептора IL-18, інгібіторів шляху передачі сигналу за участю IL-18, антагоністів IL-18, які конкурують з IL-18 і блокують IL-18-рецептор, інгібіторів продукування IL-18 та IL-18-

зв'язувальних білків, їх ізоформ, мутеїнів, злитих білків або похідних циркулярної перестановки.

У наступному варіанті даний винахід відноситься до способу лікування і/або попередження сепсису та інших захворювань, характерних для SIRS, що передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості вектора для індукції і/або посилення ендогенного продукування інгібітору IL-18 у клітині.

Крім того, даний винахід забезпечує спосіб лікування і/або попередження сепсису та інших захворювань, характерних для SIRS, що передбачає введення суб'єкту, який потребує цього, клітини, яка була генетично модифікована для продукування IL-18.

Фіг.1 показує розподіл сироваткового IL-18BPa у здорових індивідуумів. Сироватки здорових індивідуумів чоловічої і жіночої статі у віці 20-60 років, аналізовані на присутність IL-18BPa за допомогою специфічного ELISA-тесту (n=107).

Фіг.2A показує середні рівні IL-18 та IL-18BPa у пацієнтів з сепсисом і здорових суб'єктів. IL-18 та IL-18BPa у сироватці визначали у здорових індивідуумів (див. фіг.1) і у 198 пробах з 42 пацієнтів з сепсисом відразу ж після госпіталізації і під час госпіталізації.

Фіг.2B показує розподіл індивідуальних рівнів IL-18 та IL-18BPa у здорових суб'єктів і пацієнтів, описаних у фіг.2A. Середні рівні у сироватці IL-18 та IL-18BPa у здорових суб'єктів показані пунктирною вертикальною і горизонтальною лінією, відповідно.

Фіг.3 показує порівняння між загальним і вільним IL-18 у окремих пацієнтів з сепсисом після госпіталізації. Рівень вільного IL-18 (чорні кружки) у сироватках розраховували на основі концентрації загального IL-18 (білі кружки) та IL-18BPa, з врахуванням стехіометрії 1:1 IL-18 до IL-18BP у комплексі і розрахованій Kd, що складає 400 pM. Кожна вертикальна лінія зв'язує загальний і вільний IL-18 в окремій пробі сироватки.

Фіг.4 показує дію IL-18BP на *S. epidemidis*-індуковане продукування IFN- $\gamma$  у цільній крові. Суцільна кров стимулювалася тільки *S. epidemidis* або *S. epidemidis* і рекомбінантним IL-18BP у вказаних концентраціях. Після 48 годин інкубації культуру крові лізували і вимірювали IFN- $\gamma$ . Результати виражені у відсотках індукції IFN- $\gamma$  *S. epidemidis*.  $P < 0,01$  проти одного *S. epidemidis*. Дані являють собою середнє  $\pm$  стандартна похибка середнього (SEM) шести експериментів. SEM являє собою розкид середньої величини проби. SEM дає уявлення про точність середньої величини.  $SEM = SD/(\text{квадратний корінь величини проби})$ . Ці дані аналізували з використанням спареного критерію Ст'юдента.

Фіг. 5 показує інгібіторну дію, що виявляється подвійною активністю IL-18BPa і моноклональних антитіл проти IL-12, на продукування IFN- $\gamma$  цільною кров'ю, обробленою *S. epidemidis*. Цільну кров стимулювали *S. epidemidis* у присутності або за відсутності IL-18BPa (125 нг/мл), mAb до IL-12 (2,5 мкг/мл) та обох. Після 48 годин інкубації культуру крові лізували і вимірювали IFN- $\gamma$ . Результати виражені у відсотках індукції IFN- $\gamma$  *S. epidemidis*.

$P < 0,01$  проти одного *S. epidemidis*. Дані являють собою середнє  $\pm$  стандартна похибка середнього (SEM) шести експериментів. SEM являє собою розкид середньої величини проби. SEM дає уявлення про точність середньої величини.  $SEM = SD/(\text{квадратний корінь величини проби})$ . Ці дані аналізували з використанням спареного критерію Ст'юдента.

Фіг.6 показує кількісне визначення IL-18BPa, відображене у стандартній кривій ELISA. Рекомбінантний IL-18BPa людини серійно розводили і піддавали ELISA, як описано у прикладі 3. Дані результати показують середню оптичну щільність  $\pm$  SE (стандартна похибка) 10 експериментів.

Фіг. 7 показує інгібіторну дію IL-18 на кількість IL-18BPa відповідно до тесту ELISA. Показаний відсоток інгібування сигналу.

Фіг.8 показує імунологічну перехресну реактивність ізоформ IL-18BP людини. Аналіз ELISA IL-18BP виконували з усіма ізоформами (a-d) IL-18BP. Вихідні розчини (3,2 мкг/мл) ізоформ IL-18BP серійно розводили і тестували в IL-18BPa-ELISA.

Фіг.9 показує вміст IL-18 у тканині міокарда після введення LPS. Мишей ін'єктували LPS *E. coli* (0,5 мг/кг, внутрішньочеревинно). Серця гомогенізували у вказаних на x-осі часових точках. ELISA проводили для визначення вмісту IL-18 у міокарді (n=4-5 тварин на групу).

Фіг. 10 показує дію антитіла до IL-18 на індуковану LPS дисфункцію міокарда. Мишей ін'єктували або носієм (фізіологічним розчином, що ін'єктують внутрішньовенно, n=8), або LPS *E. coli* (0,5 мг/кг, що ін'єктують внутрішньочеревинно, n=8) і визначали тиск, який розвивається, у лівому шлуночку (LVDP) через 6 годин перфузії виділеного серця. В окремих експериментах мишей заздалегідь обробляли або сироваткою нормальних кроликів (NRS, n=5), або антитілом до IL-18 (анти-IL-18, n=8) за 30 хвилин перед введенням LPS.

Даний винахід відноситься до введення інгібіторів IL-18 для попередження або лікування сепсису, і він базується на відкриттях, описаних у прикладах. Відповідно до даного винаходу було виявлено, що рівні ефективного (вільного) циркулюючого IL-18 є значимо підвищеними у сироватці пацієнтів з сепсисом у порівнянні із здоровими індивідуумами, і, що інгібування IL-18 викликає зменшення індукції IFN- $\gamma$  грампозитивною бактерією *Staphylococcus epidemidis*.

Крім того, превентивне лікування сепсису може проводитися введенням інгібітору IL-18 у комбінації з інгібіторами інших цитокінів, потенційно здатними посилювати його дію.

Сепсис, відповідно до даного винаходу, включає SIRS, тяжкий сепсис, септичний шок, ендотоксинний бактеріально-токсичний шок і т.д., і може бути викликаний грампозитивними або грамнегативними бактеріями.

Термін «інгібітор IL-18» у контексті даного винаходу відноситься до будь-якої молекули, яка модулює продукування і/або дію IL-18 таким чином, що продукування і/або дія IL-18 ослаблюється, зменшується або частково, по суті або повністю запобігається або блокується.

Інгібітором продукування може бути будь-яка молекула, що негативно впливає на синтез, процесинг або дозрівання IL-18, наприклад, інгібітор ICE. Інгібіторами, що розглядаються відповідно до даного винаходу, можуть бути, наприклад, супресори експресії гена інтерлейкіну IL-18, антисмислові мРНК, що зменшують або запобігають транскрипції мРНК IL-18, або рибозими, що приводять до деградації мРНК, білки, які порушують правильне укладання, або частково або по суті запобігають секреції IL-18, протеази, що деградує IL-18, і т.п.

Інгібіторами дії IL-18 можуть бути антагоністи IL-18, наприклад, IL-18BP. Антагоністи можуть або зв'язуватися з самою молекулою IL-18, або ізолювати молекулу IL-18 з достатньою афінністю і специфічністю для часткової або по суті повної нейтралізації IL-18 або активного сайту (сайтів) IL-18, що відповідають за зв'язування з його лігандами (наприклад, з його рецепторами). Антагоніст може також інгібувати шлях передачі сигналу за участю IL-18, який активується у клітинах при зв'язуванні IL-18/рецептор.

Інгібіторами дії IL-18 можуть бути також розчинні рецептори IL-18 або молекули, що імітують дані рецептори, або агенти, які блокують рецептори IL-18 або молекули, що імітують дані рецептори, або агенти, які блокують рецептори IL-18, антитіла до IL-18, такі як моноклональні антитіла, або будь-який інший агент або молекула, що запобігає зв'язуванню IL-18 з його мішенями, зменшуючи або запобігаючи таким чином запуску внутрішньоклітинних або позаклітинних реакцій, які опосередковуються IL-18.

Термін «IL-18-зв'язувальні білки» застосовується тут як синонім «IL-18BP». Він включає в себе IL-18-зв'язувальні білки, визначені у WO 99/09063 або у Novick et al., 1999, у тому числі сплайсингові варіанти і/або ізоформи IL-18-зв'язувальних білків, визначених у Kim et al., 2000. Зокрема, ізоформи а і с IL-18BP людини застосовні відповідно до даного винаходу. Білки, застосовні відповідно до даного винаходу, можуть бути глікозильованими або неглікозильованими, вони можуть походити з природних джерел, таких як сеча, або переважно вони можуть бути одержані рекомбінантно. Рекомбінантна експресія може проводитися у прокаріотичних системах експресії, подібних до *E. coli*, або в еукаріотичних системах експресії і переважно у системах експресії ссавців.

У застосуванні тут, термін «мутеїни» відноситься до аналогів IL-18BP або аналогів вірусного IL-18BP, в яких один або декілька амінокислотних залишків IL-18BP, що зустрічається у природі, або вірусного IL-18BP замінені амінокислотними залишками, які відрізняються, або делетовані, або один, або декілька амінокислотних залишків додані до послідовності IL-18BP, що зустрічається у природі, або вірусного IL-18BP без значної зміни активності одержаних продуктів у порівнянні з IL-18BP або вірусним IL-18BP дикого типу. Дані мутеїни одержують відомими способами синтезу і/або способами сайт-направленого мутагенезу або будь-яким іншим відомим способом, придатним для цього.

Будь-який такий мутеїн переважно має послідовність амінокислот, досить аналогічну послідовності IL-18BP або досить аналогічну послідовності вірусного IL-18BP, так що він має по суті однакову активність з IL-18BP. Однією з активностей IL-18BP є його здатність зв'язувати IL-18. Доки цей мутеїн має істотну зв'язувальну активність відносно IL-18, він може бути використаний для очищення IL-18, наприклад, за допомогою афінної хроматографії, і, отже, може розглядатися, як такий, що має по суті однакову активність відносно IL-18BP. Таким чином, можна визначити, чи має будь-який конкретний мутеїн по суті ту ж саму активність, що і IL-18BP, за допомогою рутинного експериментування, яке включає як об'єкт такий мутеїн, наприклад, методом простого конкурентного сендвіч-аналізу для визначення, зв'язується він або не зв'язується з відповідним чином міченим IL-18, такого як радіоімунаналіз або аналіз ELISA.

Мутеїни поліпептидів IL-18BP або мутеїни вірусного IL-18BP, які можуть бути використані відповідно до даного винаходу, або нуклеїнові кислоти, що кодують їх, включають в себе обмежений набір по суті відповідних послідовностей як заміних пептидів або поліпептидів, які можуть бути рутинним чином одержані фахівцем з кваліфікацією у даній області без надмірного експериментування на основі представлених тут описів і керівних вказівок.

Переважними замінами для мутеїнів відповідно до даного винаходу є так звані «консервативні заміни». Консервативні заміни амінокислот поліпептидів або білків IL-18BP, або вірусного IL-18BP можуть включати в себе синонімічні амінокислоти у групі, які мають досить подібні фізико-хімічні властивості, так що заміна між членами цієї групи буде зберігати біологічну функцію даної молекули (Grantham, 1974).

Ясно, що вставки і делеції амінокислот також можуть бути здійснені в описаних вище послідовностях без зміни їх функції, зокрема, якщо ці вставки або делеції включають в себе тільки невелике число амінокислот, наприклад, менше тридцяти, і, переважно, менше десяти, і не видаляють або не замінюють амінокислоти, які є критичними для функціональної конформації, наприклад, залишки цистеїну. Білки і мутеїни, що продукуються такими делеціями і/або вставками, входять в обсяг даного винаходу.

Переважними групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у таблиці I. Більш переважно, групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у таблиці II; і, найбільш переважно, групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у таблиці III.

ТАБЛИЦЯ I

Переважні групи синонімічних амінокислот

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

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

Приклади одержання амінокислотних замін у білках, які можуть бути використані для одержання мутеїнів поліпептидів або білків IL-18BP, або мутеїнів вірусних IL-18BP для застосування у даному винаході, включають в себе будь-які відомі стадії способу, такі як представлені у Патентах США за номерами RE 33653, 4959314, 4588585 і 4737462, Mark et al.; 5116943, Kothe et al.; 4965195, Namen et al.; 4879111, Chong et al. і 5017691, Lee et al., і білки із замінами амінокислот лізином, представлені у Патенті США № 4904584 (Shaw et al.).

Термін «злиті білки» відноситься до поліпептиду, що містить IL-18BP або вірусний IL-18BP, або його мутеїн, або фрагмент, злиті з іншим білком, який, наприклад, має продовжений час існування у рідинах тіла. Так, IL-18BP або вірусний IL-18BP можуть бути злиті з іншим білком, поліпептидом або т.п., наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом.

Термін «функціональні похідні» у застосуванні тут охоплює похідні IL-18BP або вірусного IL-18BP та їх мутеїни і злиті білки, які можуть бути одержані з функціональних груп, що зустрічаються у вигляді бічних ланцюгів на залишках, або N-, або C-кінцевих груп способами, відомими у даній області, і є включеними у даний винахід, доки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто

вони не порушують активність даного білка, яка є по суті однаковою з активністю IL-18BP або вірусних IL-18BP, і не додають токсичних властивостей композиціям, що містять їх.

Дані похідні можуть, наприклад, включати в себе бічні ланцюги поліетиленгліколю (ПЕГ-кон'юговані), які можуть маскувати антигенні сайти і продовжувати існування IL-18BP або вірусного IL-18BP у рідинах тіла. Інші похідні включають в себе аліфатичні складні ефіри карбоксильних груп, амід карбоксильних груп, утворені реакцією з аміаком або з первинним, або вторинним амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, утворені з ацильними групами (наприклад, алканойльною або карбоциклічною ароматичною групами) або O-ацилпохідні вільних гідроксильних груп (наприклад, серинового або треонінового залишків), утворених з ацильними групами.

Як «активні фракції» IL-18BP або вірусного IL-18BP, мутеїнів і злитих білків даний винахід включає в себе будь-який фрагмент або попередників поліпептидного ланцюга тільки білкової молекули або разом з асоційованими з нею молекулами або зв'язаними з нею залишками, наприклад, цукровими або фосфатними залишками, або агрегати білкової молекули, або цукрових залишків один з одним, за умови, що вказана фракція має по суті таку саму активність з IL-18BP.

Функціональні похідні IL-18BP можуть бути кон'юговані з полімерами для поліпшення властивостей білка, таких як стабільність, напівперіод існування в організмі, біодоступність, переносність організмом людини або імуногенність. Для досягнення цієї мети IL-18BP може бути зв'язаний, наприклад, з поліетиленгліколем (ПЕГ). Кон'югування з ПЕГ може проводитися відомими способами, наприклад, описаними у WO 92/13095.

Таким чином, у переважному варіанті даного винаходу IL-18BP є кон'югованим з ПЕГ.

У наступному переважному варіанті здійснення даного винаходу інгібітор IL-18 є злитим білком, що містить весь IL-18-зв'язувальний білок або частину IL-18-зв'язувального білка, які злиті з усім імуноглобуліном або з частиною імуноглобуліну. Особі з кваліфікацією у даній області буде зрозуміло, що одержаний злитий білок зберігає біологічну активність IL-18BP, зокрема, зв'язування з IL-18. Це злиття може бути прямим або через короткий лінкерний пептид, який може бути таким коротким, як 1-3 амінокислотних залишки у довжину, або більш довгим, наприклад, таким, що має 13 амінокислотних залишків у довжину. Вказаний лінкер може бути, наприклад, трипептидом послідовності E-F-M (Glu-Phe-Met), або лінкерною послідовністю, що складається з 13 амінокислот, яка містить Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, введені між послідовністю IL-18BP і послідовністю імуноглобуліну. Одержаний злитий білок має поліпшені властивості, наприклад, продовжений час існування у рідинах тіла (напівперіод існування в організмі), збільшену питому активність, збільшений рівень експресії, або полегшується очищення цього злитого білка.



IL-18BP може бути злитий з константною ділянкою молекули Ig. Переважно він злитий з районами важкого ланцюга, наприклад, з доменами CH2 і CH3 IgG1 людини. Генерування специфічних злитих білків, що містять IL-18BP і частину імуноглобуліну, описані, наприклад, у прикладі 11 WO 99/09063. Інші ізоформи молекул Ig також придатні для генерування злитих білків даного винаходу, наприклад, ізоформи IgG<sub>2</sub> або IgG<sub>4</sub>, або інших класів Ig, наприклад, таких як IgM або IgA. Злиті білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними.

Інгібітор IL-18 може бути, наприклад, антагоністом молекули, яка зв'язує рецептор IL-18, але здатна запускати шлях передачі сигналу, що активується при зв'язуванні даного цитокіну з вказаним рецептором (наприклад, IL-1-Ra, Dinarello 1996). Всі групи антагоністів є прийнятними, або окремо, або разом, у комбінації з інгібітором IL-18 у терапії сепсису.

Інгібітором IL-18 може бути специфічне антитіло до IL-18. Антитіла до IL-18 можуть бути поліклональними або моноклональними, химерними, гуманізованими або навіть повністю людськими. Реконбінантні антитіла та їх фрагменти характеризуються високою афінністю зв'язування з IL-18 *in vivo* і низькою токсичністю. Антитіла, які можуть бути використані у даному винаході, відрізняються їх здатністю лікувати пацієнтів протягом періоду, достатнього, щоб мати регрес хорошого - чудового ступеня або ослаблення патогенного стану, або будь-якого симптому з групи симптомів, зв'язаних з патогенним станом, і низьку токсичність.

Було показано, що IL-18 збільшується у ході дисфункції серця, яка викликається сепсисом. Одночасне введення LPS разом з інгібітором IL-18, таким як нейтралізуюче поліклональне антитіло до IL-18, захищає від дисфункції міокарда, що індукуюється LPS.

Нейтралізуючі антитіла легко індукуються у тварин, таких як кролики, кози або миші, імунізацією IL-18. Імунізовані миші особливо застосовні для забезпечення джерел В-клітин для приготування гібридом, які, у свою чергу, культивують для одержання великих кількостей моноклональних антитіл до IL-18.

Химерні антитіла є молекулами імуноглобуліну, які характеризуються двома або декількома сегментами або частинами, що походять з різних видів тварин. Звичайно варіабельна ділянка химерного антитіла походить з антитіла ссавця, що не є людиною, наприклад, мишачого моноклонального антитіла, а константна ділянка імуноглобуліну походить з молекули імуноглобуліну людини. Переважно, обидві ці ділянки і комбінація їх має низьку імуногенність, як можна визначити рутинними способами (Elliot et al., 1994). Гуманізовані антитіла є молекулами імуноглобуліну, створеними способами генної інженерії, в яких мишачі константні ділянки замінені копіями імуноглобуліну людини при збереженні мишачих районів зв'язування антигену. Одержане химерне антитіло миша-людина переважно має зменшену імуногенність і поліпшену фармакокінетику у людини (Knight et al., 1993).

Таким чином, у наступному переважному варіанті антитіло проти IL-8 є гуманізованим антитілом до IL-18. Переважні приклади гуманізованих антитіл до IL-18 описані, наприклад, в Європейській заявці на патент EP 0974600.

Ще в одному переважному варіанті антитіло до IL-18 є повністю людським. Технологія одержання антитіл людини описана детально, наприклад, у WO 00/76310, WO 99/53049, US 6162963 або AU5336100. Повністю людські антитіла є переважно реконбінантними антитілами, які продукуються у трансгенних тваринах, наприклад, коєномишах, і містять всі функціональні локуси Ig людини або частини функціональних локусів Ig людини.

Поліпептидні інгібітори можуть бути одержані у прокаріотичних або еукаріотичних реконбінантних системах або можуть кодуватися у векторах, сконструйованих для націлювання генів.

Разом з інгібіторами IL-18 у лікуванні сепсису можуть бути використані інгібітори інших цитокінів. Інгібітор IL-18 може бути використаний у комбінації з інгібітором IL-12.

Термін «інгібітор IL-12» у контексті даного винаходу відноситься до будь-якої молекули, яка модулює продукування і/або дію IL-12 таким чином, що продукування і/або дія IL-12 ослаблюється, зменшується або частково, по суті або повністю запобігається або блокується.

Інгібітором продукування IL-12 може бути будь-яка молекула, яка негативно впливає на його синтез, наприклад, інтерферон  $\alpha/\beta$  (Kaір et al. 2000), або молекула, що негативно впливає на процесинг або дозрівання IL-12. Інгібіторами, що розглядаються відповідно до даного винаходу, можуть бути, наприклад, супресори експресії гена інтерлейкіну IL-12, антисмислові мРНК, що зменшують або запобігають транскрипції мРНК IL-12, або рибозими, що приводять до деградації мРНК IL-12, білки, що порушують правильне укладання, або частково або по суті запобігають секреції IL-12, протеази, що деградує IL-12, і т.п.

Антагоністи IL-12 виявляють свою активність декількома шляхами. Антагоністи можуть зв'язуватися з самою молекулою IL-12 або можуть ізолювати молекулу IL-12 з достатньою афінністю і специфічністю для часткової або по суті повної нейтралізації епітопу або епітопів IL-12, які відповідають за зв'язування рецептора IL-12 (далі називаються "ізолюючими антагоністами"). Ізолюючим антагоністом може бути, наприклад, антитіло, направлене проти IL-12, укорочена форма рецептора IL-12, що містить позаклітинні домени цього рецептора або його функціональні частини і т.д. Антагоністи можуть також інгібувати шлях передачі сигналу за участю IL-12, який активується у клітинах при зв'язуванні IL-12/рецептор (далі називаються "антагоністами передачі сигналів"). Всі групи антагоністів застосовні, окремо або разом, у комбінації з інгібітором IL-18, у терапії сепсису. Антагоністи IL-12 легко ідентифікуються і оцінюються рутинним скринінгом кандидатів на їх дію на активність нативного IL-12 на чутливих клітинних лініях *in vitro*, наприклад, мишачих спленоцитах, в яких форболовий ефір і IL-12 викликають проліфера-

цію. Даний аналіз містить композицію IL-12 у розведеннях антагоніста-кандидата, що варіюються, наприклад, від 0,1 до 100-разових відносно молярної кількості IL-12, що використовується у цьому аналізі, і контролі без IL-12, тільки з антагоністом або форболовим ефіром та IL-2 (Tucci et al., 1992).

Ізолюючі антагоністи є переважними антагоністами IL-12 для використання відповідно до даного винаходу. Серед ізолюючих антагоністів переважними є антитіла, які нейтралізують активність IL-12. Відповідно до даного винаходу переважним є одночасне, послідовне або роздільне застосування інгібітору IL-18 з антагоністом IL-12. Антитіло до IL-12 є переважним антагоністом IL-12 для застосування у комбінації з інгібітором IL-18, так само як похідні, фрагменти, райони і біологічно активні частини даного антитіла. Інгібітор IL-18 може бути використаний одночасно, послідовно або роздільно з інгібітором IL-12.

Крім того, інгібітор IL-18 може бути використаний у комбінації з інгібіторами інших цитокінів, про які відомо, що вони грають важливу роль у септичному шоку, наприклад, IL-1, TNF, IL-8 і т.д., Dinarello 1996 і Okusawa et al. 1988. Прикладом інгібітору IL-1 є антагоніст рецептора IL-1, а прикладом інгібітору TNF є розчинна частина рецепторів TNFRI і TNFRII.

Термін «інгібітор цитокінів» у контексті даного винаходу відноситься до будь-якої молекули, що модулює продукування і/або дію вказаного цитокіну (наприклад, інгібіторів ICE у випадку IL-1) таким чином, що його продукування і/або дія ослаблюється, зменшується або частково, по суті або повністю запобігається або блокується.

Інгібітором продукування може бути будь-яка молекула, яка негативно діє на синтез, процесинг або дозрівання вказаного цитокіну. Інгібіторами, що розглядаються відповідно до даного винаходу, можуть бути, наприклад, супресори експресії гена цитокіну, антисмислові мРНК, що зменшують або запобігають транскрипції мРНК цитокіну, або рибозими, що приводять до деградації мРНК, білки, що порушують правильне укладання, або частково, або по суті запобігають секреції вказаного цитокіну, протеази, що деградують даний цитокін і т.п.

Антагоністи цитокінів виявляють свою активність декількома шляхами. Антагоністи можуть зв'язуватися з самою молекулою цитокіну або можуть ізолювати молекулу цитокіну з достатньою афінністю і специфічністю для часткової або по суті повної нейтралізації епітопу або епітопів цитокіну, що відповідають за зв'язування рецептора цитокіну (далі називаються "ізолюючими антагоністами"). Ізолюючим антагоністом може бути, наприклад, антитіло, направлене проти цитокіну, укорочена форма рецептора цитокіну (наприклад, розчинний рецептор TNFRI і TNFRII у випадку TNF), що містить позаклітинні домени рецептора або його функціональні частини і т.д. Альтернативно, антагоністи цитокінів можуть інгібувати шлях передачі сигналу за участю цитокіну, який активується рецептором клітинної поверхні після зв'язування цитокіну (далі називаються "антагоністами передачі сигналів"). Антагоніст може бути також молекулою, яка зв'язує рецептор, але не здатна

запускати шлях передачі сигналу, що активується після зв'язування даного цитокіну з вказаним рецептором (наприклад, IL-1-Ra, Dinarello 1996). Всі групи антагоністів застосовні, окремо або разом, у комбінації з інгібітором IL-18, у терапії сепсису.

Інгібітор IL-18 може бути використаний одночасно, послідовно або роздільно з описаними вище інгібіторами цитокінів.

Даний винахід відноситься також до застосування експресуючого вектора, що містить кодуєчу послідовність інгібітору IL-18, у приготуванні лікарського засобу для попередження і/або лікування сепсису. Таким чином, генотерапевтичний підхід використовується для лікування і/або попередження даного захворювання. Вигідним чином, експресія інгібітору IL-18 буде відбуватися потім *in situ*, ефективно блокуючи IL-18 безпосередньо у тканині (тканинах) або клітинах, уражених цим захворюванням.

Застосування вектора для індукції і/або посилення ендогенного продукування інгібітору IL-18 у клітині, у нормі, що мовчить відносно експресії інгібітору IL-18 або експресує кількості цього інгібітору, які є недостатніми, також розглядається відповідно до даного винаходу. Цей вектор може містити регуляторні послідовності, функціональні у клітинах, в яких бажано експресувати даний інгібітор або IL-18. Такими регуляторними послідовностями можуть бути, наприклад, промотори або енансери. Потім ця регуляторна послідовність може бути введена у правильний локус геному гомологічною рекомбінацією для зв'язування таким чином цієї регуляторної послідовності з геном, експресія якого повинна бути індукована або посилена. Даний спосіб звичайно називають «активацією ендогенного гена» (EGA), і він описаний, наприклад, у WO 91/09955.

Даний винахід включає в себе також введення генетично модифікованих клітин, які здатні продукувати інгібітор IL-18, для лікування або попередження сепсису.

Фахівцеві з кваліфікацією у даній області буде зрозуміло, що можливим є також вимикання експресії IL-18 з використанням того ж самого способу, тобто введенням елемента негативної регуляції, наприклад, елемента, який індукує мовчання гена, у локус гена IL-18, що приводить до зниження регуляції або припинення експресії IL-18. Особі з кваліфікацією у даній області буде зрозуміло, що таке зниження регуляції або індукування мовчання експресії гена здійснює таку ж дію, що і застосування інгібітору IL-18 для попередження і/або лікування захворювання.

Вираз «фармацевтично прийнятний» означає будь-який носій, що не впливає на ефективність біологічної активності активного інгредієнта і не є токсичним для хазяїна, в який його вводять. Наприклад, для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення активний білок (активні білки) може бути приготований в уніфікованій дозованій формі для ін'єкції у таких носіях, як фізіологічний розчин, розчин декстрази, розчин сироваткового альбуміну і розчин Рінгера.

Активні інгредієнти фармацевтичної композиції даного винаходу можуть вводитися індивідууму різними способами. Способи введення включають інтрадермальний, трансдермальний (наприклад, у випадку композицій повільного вивільнення), внутрішньом'язовий, внутрішньочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, епідуральний, локальний та інтраназальний способи.

Може бути використаний будь-який інший терапевтично ефективний спосіб введення, наприклад, абсорбція через епітеліальні або ендотеліальні тканини або з використанням генотерапії, в якій пацієнту вводять молекулу ДНК, що кодує активний агент (наприклад, за допомогою вектора), що викликає експресію і секрецію цього активного агента *in vivo*. Крім того, білок (білки) даного винаходу може вводитися разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, такими як фармацевтично прийнятні поверхнево-активні речовини, ексципієнти, носії, розріджувачі та наповнювач.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення активний білок (активні білки) можуть бути приготовані у вигляді розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку разом з фармацевтично прийнятним парентеральним наповнювачем (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) і домішками, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стабільність (наприклад, консерванти або буфери). Готову форму стерилізують способами, що звичайно використовуються для цього.

Біодоступність активного білка (активних білків) даного винаходу може бути також поліпшена з використанням процедур кон'югації, які збільшують напівперіод існування молекули у тілі людини, наприклад, зв'язуванням цієї молекули з поліетиленгліколем, як описано у патентній заявці PCT WO 92/13095.

Терапевтично ефективні кількості активного білка (активних білків) будуть залежати від багатьох змінних, у тому числі від типу антагоніста, афінності антагоніста відносно IL-18, будь-якої залишкової цитотоксичної активності, що виявляється даними антагоністами, способу введення, клінічного стану пацієнта (у тому числі від бажаності підтримки нетоксичного рівня активності ендогенного IL-18).

«Терапевтично ефективною кількістю» є така кількість, при введенні якої інгібітор IL-18 приводить до інгібування біологічної активності IL-18. Доза, що вводиться у вигляді єдиної дози або множинних доз індивідууму, буде варіюватися в залежності від великої кількості факторів, у тому числі від фармакокінетичних властивостей інгібітору IL-18, способу введення, стану і характеристик (статі, віку, ваги тіла, здоров'я, росту) пацієнта, ступеня симптомів, супутніх лікувальних заходів, частоти введення і бажаного ефекту. Корекція і маніпулювання відносно встановлених діапазонів доз знаходяться повністю у компетенції фахівців з кваліфікацією у даній області, як і способи визначення *in vitro* та *in vivo* інгібування IL-18 у індивідуума.

Відповідно до даного винаходу, інгібітор IL-18 може вводитися профілактично або терапевтично індивідууму, який потребує цього, перед застосуванням інших програм лікування або агентів, одночасно або послідовно з іншими програмами лікування або агентами (наприклад, схемами лікування множинними лікарськими засобами) у терапевтично ефективній кількості, зокрема, з інгібітором IL-12 і/або інгібітором IL-1, антагоністом інтерферону і TNF. Активні агенти, які вводять одночасно з іншими терапевтичними агентами, можуть вводитися у тих же самих або в інших композиціях.

Далі, даний винахід відноситься до способу приготування фармацевтичної композиції змішуванням ефективної кількості інгібітору IL-18 і/або інгібітору IL-12, і/або інгібітору IL-1, антагоніста інтерферону, і/або TNF з фармацевтично прийнятним носієм.

Після опису даного винаходу він буде більш зрозумілим при посиланні на наступні приклади, які приведені як ілюстрація і не призначені для обмеження даного винаходу.

Приклад 1 Рівні IL-18BPa та IL-18 сироватки здорових індивідуумів і пацієнтів з сепсисом

Вимірювання специфічних циркулюючих у кровотоці цитокінів і їх природних інгібіторів у здорових і хворих індивідуумів забезпечує інформацію про їх участь у прогресуванні та ступені тяжкості захворювання. Як згадувалося у розділі передумов винаходу, одним з ключових медіаторів сепсису є IFN- $\gamma$ . Оскільки IL-18 є ко-індуктором IFN- $\gamma$ , проводили моніторинг рівня IL-18 і його природного інгібітору, сплайсингового варіанта IL-18BPa, у пацієнтів з сепсисом і порівнювали з рівнями, що виявляються у здорових суб'єктів, з використанням специфічних аналізів ELISA (приклад 3).

Рівні IL-18 і IL-18BPa у здорових суб'єктів

Середній рівень IL-18 у 107 здорових донорів був  $64 \pm 17$  пг/мл, як виміряно з використанням ECL-аналізу (електрохемилюмінесцентного аналізу) (Pomerantz et al. 2001). ECL-аналіз випробовували на інтерференцію (перешкоди), що викликаються спорідненими білками. Було виявлено, що на нього не впливала присутність зрілого IL-1 $\beta$  або про-IL-1 $\beta$ , тоді як про-IL-18 був перекресно реактивним. Таким чином, 20% зрілого IL-18, що детектується, у пробах сироватки людини у даному дослідженні можуть бути про-IL-18. IL-18BPa при концентрації  $\leq 160$  нг/мл не впливав на ECL-аналіз IL-18.

Рівні IL-18BPa визначали у сироватці із 107 здорових індивідуумів з використанням ELISA (приклад 3). Рівні IL-18BPa були у діапазоні від 0,5 нг/мл до такої високої величини, як 7 нг/мл, при середній величині, що складає  $2,15 \pm 0,15$  нг/мл (фіг. 1).

Оскільки як IL-18, так і IL-18BPa спільно присутні у сироватці, деяка частина IL-18 може бути присутньою у комплексі з IL-18BPa. Рівень вільного IL-18 розраховували на основі середнього рівня загального IL-18 ( $2,15$  нг/мл). Вільний IL-18 визначали відповідно до закону дії мас. Розрахунок базувався на наступних параметрах: концентрації

загального IL-18, визначені за допомогою ECL-аналізу; концентрація загального IL-18BPa, визначена за допомогою ELISA; стехіометрія 1:1 у комплексі IL-18BPa та IL-18 і константа дисоціації ( $K_d$ ), що складає 0,4 нМ (Novick et al. 1999 і Kim et al. 2000). У рівноважній системі  $L+R \leftrightarrow LR$ , де L являє собою IL-18, а R являє собою IL-18BP, застосовні наступні рівняння:

$$K_d = [LR] / ([L_{\text{вільн}}][R_{\text{вільн}}])$$

$$L_{\text{вільн}} = L_{\text{заг}} - LR$$

$$R_{\text{вільн}} = R_{\text{заг}} - LR$$

За допомогою підставлення:  $L_{\text{заг}} = 64 \pm 17$  пг/мл (середній рівень),  $R_{\text{заг}} = 2,15 \pm 0,15$  нг/мл (середнє) і  $K_d = 0,4$  нМ, було знайдено, що у здорових суб'єктів приблизно 51,2 пг/мл IL-18 (близько 80% від загальної кількості) знаходиться у його вільній формі.

Рівні IL-18 та IL-18BPa у пацієнтів з сепсисом

Рівні IL-18 та IL-18BPa визначали у 192 пробках сироваток з 42 пацієнтів з сепсисом відразу ж після госпіталізації і під час госпіталізації. Рівні як IL-18, так і IL-18BPa були значимо більш підвищеними у пацієнтів з сепсисом у порівнянні із здоровими суб'єктами (фіг.2A), і спостерігався широкий розкид величин (фіг.2B).

Крім того, ці рівні були навіть більш високими у даних пацієнтів у день госпіталізації, показуючи 22-разове збільшення у рівні IL-18 у порівнянні із здоровими індивідуумами ( $1,5 \pm 0,4$  нг/мл проти  $0,064 \pm 0,17$  нг/мл) і 13-разове збільшення у рівні IL-18BPa ( $28,6 \pm 4,5$  нг/мл проти  $2,15 \pm 0,15$  нг/мл, фіг.2A). Не змогли спостерігати статистично значимої кореляції між рівнями креатиніну і концентраціями або IL-18, або IL-18BPa у даних сироватках (яка оцінюється за допомогою оцінки APACHE II Knaus et al. (1993)), що припускає, що підвищені рівні IL-18 і IL-18BPa у даних пацієнтів не були обумовлені нирковою недостатністю.

Оскільки рівні IL-18 та IL-18BPa у сироватці пацієнтів з сепсисом значно варіювали (фіг.2B), розраховували рівні вільного IL-18 у сироватці в індивідуальних пробках. Дані розрахунки проводили, як описано раніше, з використанням тих же самих трьох рівнянь і підставленням у них величин  $K_d$ ,  $L_{\text{заг}}$ ,  $R_{\text{заг}}$ , одержаних експериментально. Ці розрахунки показують, що IL-18BPa зменшував рівень вільного IL-18 у більшості пацієнтів (фіг.3). Помітно, що цей ефект був особливо сильним, коли загальний IL-18 був дуже високим. Наприклад, у двох пацієнтів сироватковий IL-18 досягав величини 0,5 нМ (10 нг/мл), 150-разового збільшення у порівнянні зі здоровими індивідуумами. Однак, з врахуванням зв'язування з циркулюючим IL-18BPa (27 нг/мл і 41,2 нг/мл) рівень вільного IL-18 у даних двох пацієнтів падав на 78% і 84%, відповідно (фіг.3). Таким чином, велика частина сироваткового IL-18 блокується циркулюючим у кровотоці IL-18BPa. І все-таки, відповідно до цих розрахунків, вільний IL-18, що залишився, є все ще більш високим, ніж IL-18, який виявляється у здорових індивідуумів. Таким чином, очікується, що введення екзогенного IL-18BPa пацієнтам з сепсисом додатково знижує рівень вільного циркулюючого у кровотоці IL-18, викликаючи ослаблення кінця захворювання.

Приклад 2 Дія IL-18BPa на *S. epidemidis*-індуковане продукування IFN- $\gamma$  у клітинах, що присутні у пробках цільної крові із здорових суб'єктів

Як згадувалося у розділі передумов винаходу, відомо, що грампозитивна бактерія *Staphylococcus epidemidis* викликає сепсис. Відбувається індукція цитокінів, наприклад, IL-1, IFN- $\gamma$  і TNF- $\alpha$ , які є ключовими медіаторами для даної патології. Оскільки IL-18 є ко-індуктором IFN- $\gamma$ , випробовували дію його інгібування на індукцію IFN- $\gamma$  *Staphylococcus epidemidis*. IL-18BPa, що використовується як інгібітор IL-18, був рекомбінантним міченим гістидином варіантом, що продукується у клітинах CHO.

0,5 мл крові змішували у круглодонних поліпропіленових пробірках 12x75 мм на 5 мл (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) з 0,5 мл середовища для вирощування RPMI (Cellgro Mediatech, Hendon, VA, доповненого 10 мМ L-глутаміну, 100 Е/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину і 10% ФТС [Gibco BRL, Grand Island, NY]), що містить *S. epidemidis* (з ATCC) з IL-18BP або без IL-18BP. Проби інкубували при 37°C (5% CO<sub>2</sub>) протягом 48 годин з подальшою обробкою Тритоном X-100 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) при кінцевій концентрації 5% для лізису клітин, присутніх у пробі цільної крові. Пробірки, що містять дані проби, перевертали декілька разів, доки проба крові не набувала прозорого вигляду. Концентрацію IFN- $\gamma$  у цих лізованих пробках крові, яка являла собою як внутрішньоклітинний, так і секретований цитокін, вимірювали електрехемілюмінесценцією (ECL), як описано Pomerantz et al. (2001).

Для даного дослідження використовували суцільну кров здорових некурящих добровольців. Кров брали венепункцією і зберігали у гепаринізованих пробірках. *S. epidemidis* розмножували в інфузійному бульйоні для головного мозку-серця протягом 24 годин, промивали в апірогенному сольовому розчині і кип'ятили, як описано Aiura et al. (1993). Концентрацію вбитих нагріванням бактерій доводили до 10 бактеріальних клітин на один лейкоцит (WBC).

Результати, приведені на фіг.4, показують, що IL-18BPa здатний інгібувати індукцію IFN- $\gamma$  *S. epidemidis*.

Оскільки відомо, що IFN- $\gamma$  коstimулюється IL-18 та IL-12, досліджували дію комбінації IL-18BPa і специфічних антитіл проти IL-12 (mAb проти IL-12 людини 11.5.14. Preprotech, Rocky Hill, NY) на індукцію IFN- $\gamma$ , що викликається *S. epidemidis*. Дану індукцію тестували у присутності 125 нг/мл IL-18BPa (міченого гістидином IL-18BPa, що продукується у клітинах COS і очищеного на talon-колонці, як описано Novick et al. 1999) і 2,5 мкг/мл антитіла, специфічного відносно IL-12 людини. Результати, показані на фігурі 5, припускають, що специфічні антитіла проти IL-12 стимулюють інгібіторну дію IL-18BPa на індукцію IFN- $\gamma$  *S. epidemidis*.

Приклад 3

Розробка IL-18BP-специфічного тесту ELISA

ELISA містив два антитіла проти IL-18BPa: мишаче моноклональне антитіло mAb 582.10, субклон mAb 582, описаний у прикладі 4, як захоплює антитіло і кроляче поліклональне антитіло для детектування (приклад 4). Мікротитраційні 96-

ямкові планшети ELISA (Maxisorb; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) покривали анти-IL-18BPа mAb № 582.10 (субклоном mAb 582, 4 мкг/мл у ФСБ) протягом ночі при 4°C. Дані планшети промивали ФСБ, що містить 0,05% Твін 20 (промивальним розчином), і блокували (2 год., 37°C) вихідним розчином БСА (KPL, Geithersburg, MD), розведеним 1:10 у воді. Вихідний розчин БСА розводили 1:15 у воді (розріджувач) для розведення всіх проб, що випробовуються, і детектуючого антитіла. Проби сироватки розводили щонайменше 1:5 у цьому розріджувачі та аліквоти по 100 мкл додавали в ямки. Високоочищений rIL-18BPа (одержаний у клітинах CHO і очищений імуноафінно з використанням білок G-очищеного моноклонального антитіла mAb № 430, специфічного відносно IL-18BP, показаного у таблиці 1 прикладу 4) розводили за допомогою 7 серійних 2-разових розведень (4 - 0,062 нг/мл) і додавали у кожний планшет ELISA для одержання стандартної кривої. Дані планшети інкубували протягом 2 годин при 37°C і промивали 3 рази промивальним розчином. Додавали кролячу анти-IL-18BPа-сироватку (1:5000 у розріджувачі, 100 мкл на ямку) і планшети додатково інкубували протягом 2 годин при 37°C. Планшети промивали 3 рази, додавали кон'югат козячі анти-кролячі антитіла-пероксидаза хрому (HRP, Jackson ImmunoResearch Labs, 1:10000 у ФСБ, 100 мкл на ямку), і планшети інкубували протягом 1 години при 37°C. Дані планшети промивали 3 рази і виявляли додаванням субстрату для пероксидази OPD (о-фенілендіаміндігідроклоридні таблетки, Sigma) і витримували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли 3 н HCl (100 мкл), і оптичну щільність при 492 нм визначали ELISA-рідером. OD представляли у вигляді графіка як функцію концентрації IL-18BPа, і спостерігали лінійний характер кривої у діапазоні 0,12-2,00 нг/мл IL-18BPа (фіг.6).

Стандартна крива IL-18BPа за відсутності сироватки або у присутності до 20% сироватки людини залишалася однією і тією ж. Оскільки IL-18BPа зв'язує IL-18 з дуже високою афінністю, було необхідно визначити, чи розрізняє аналіз ELISA між вільним і зв'язаним IL-18BPа. Було виявлено, що IL-18 заважає ELISA IL-18, однак це

втручання в аналіз є незначущим у пробах сироватки. У 90% пацієнтів з сепсисом рівні IL-18 у сироватці були нижче 4 нг/мл (див. нижче). Такі проби сироватки мали підвищений IL-18BPа, так що було потрібне розведення їх у 5-20 разів перед вимірюванням IL-18BPа. При таких розведеннях перешкоди IL-18 були менше 10% (фіг.7). Інші споріднені цитокіни, у тому числі про-IL-18, що використовується при 10-разовому молярному надлишку відносно IL-18BPа, а також 200-разовий надлишок зрілого IL-1 $\beta$ , не заважали у цьому аналізі.

Найбільш представленою ізоформою IL-18BP людини є IL-18BPа, тоді як ізоформи b, c і d є мінорними сплайсінговими варіантами (Novick et al. 1999 і Kim et al. 2000). IL-18BPа виявляє найвищу афінність відносно IL-18 (Kim et al. 2000). Афінність IL-18BPс відносно IL-18 є у 10 разів нижчою, тоді як ізоформи b і d не зв'язують або не нейтралізують IL-18. Таким чином, було важливо визначити перехресну реактивність IL-18BPа в ELISA з іншими ізоформами IL-18BP. Як показано на фіг.8, IL-18BPс людини генерував у 10 разів нижчий сигнал у розрахунку на вагу у порівнянні з IL-18BPа людини, тоді як ізоформи IL-18BP людини b і d давали незначущий сигнал у цьому аналізі ELISA.

Приклад 4 Одержання специфічних анти-IL-18BP-антитіл

Кролика ін'єктували rIL-18BPа-His6 для генерування поліклональних антитіл.

Для одержання моноклональних антитіл самок мишей Balb/C ін'єктували 5 разів 10 мкг рекомбінантного міченого гістидином IL-18BPа (rIL-18BPа-His6). Миші, яка виявляє найвищий титр, що визначається оберненим радіоімуноаналізом (IRIA, приклад 5) або твердофазовим RIA (sRIA, приклад 5), вводили кінцеву бустер-ін'єкцію внутрішньочеревинно за 4 або за 3 дні перед злиттям. Лімфоцити одержували з селезінки, і виконували злиття з мієломними клітинами NSO/1. Гібридами, які, як було виявлено, продукують антитіла до IL-18BPа, субклонували способом лімітуючого розведення. Одержані клони аналізували за допомогою IRIA (приклад 5). Репрезентативні гібридами показані у таблиці 1.

Таблиця 1

Репрезентативні гібридами, що продукують анти-IL-18BPа

№ mAb	IRIA <sub>1</sub> (імп/хв)	sRIA <sub>2</sub> (імп/хв)
148	23912	7941
297	1652	6483
369	316	12762
430	6887	3254
433	1009	15300
460	3199	4326
485	400	13010
582	15000	17897
601	1046	1928

1 Планшети, покриті козячими антимишачими антитілами, і гібридами, що детектуються  $^{125}\text{I}$ -IL-18BP.

2 Планшети, покриті IL-18BP сечі, та гібридами, що детектуються козячими антимишачими  $^{125}\text{I}$ -антитілами.

Гібридами, що секретують антитіла, направлені проти гістидинової мітки, викидали. Антитіла додатково характеризували за допомогою sRIA по їх здатності пізнавати IL-18BP, що зустрічається у природі (очищений з сечі). Характеристики зв'язування декількох позитивних гібридом показані у таблиці 1. Гібридами № 148, 430, 460 і 582 були позитивними з обома IL-18BP, рекомбінантним і виділеним з сечі IL-18BP. Одержували антитіла, придатні для Вестерн-блотингу, імунопреципітації, імуноафінного очищення і для розробки специфічних ELISA. Позитивні клони, що продукують специфічні антитіла проти IL-18BP, ін'єктували у мишей Balb/C, заздалегідь праймованих пристаном (2,6,10,14-тетраметилпентадеканом), для одержання асцитів. Ізотипи даних антитіл визначали з використанням ELISA з антитілом проти мишачого IgG (Amersham-Pharmacia Biotech). Для збирання IL-18BP-специфічного ELISA (приклад 3) використовували mAb 582, яке було високо реактивним з рекомбінантним і природним IL-18BP (таблиця 1).

Антитіла випробовували за допомогою sRIA у присутності IL-18 (приклад 5) на їх здатність пізнавати комплекс IL-18BP з IL-18. Більшість антитіл не були здатні пізнавати IL-18BP, коли він був у комплексі з IL-18. Таким чином, дані антитіла, очевидно, направлені проти лігандзв'язувального домену IL-18BP.

#### Приклад 5

Радіоімуноаналізи для детектування клітинних клонів, що продукують антитіло проти IL-18BP. Обернений радіоімуноаналіз (IRIA)

Мікروتитраційні планшети з PVC (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) покривали протягом ночі при 4°C афінно очищеними козячими антимишачими F(ab')<sub>2</sub>-антитілами (10 мкг/мл, 100 мкл на ямку; Jackson ImmunoResearch Labs). Потім планшети промивали двічі ФСБ, що містить 0,05% Твін 20 (промивальним розчином), і блокували БСА (0,5% у промивальному розчині) протягом 2 годин при 37°C. Додавали культуральні супернатанти гібридом (100 мкл на ямку), і планшети інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Планшети промивали три рази, у кожному ямку додавали  $^{125}\text{I}$ -rIL-18BP-His6 ( $10^5$  імп/хв у 100 мкл), і планшети інкубували протягом 5 годин при 22°C. Потім планшети промивали три рази, і окремі ямки підраховували у гамма-лічильнику. Гібридами, що генерують супернатанти, які виявляли зв'язану радіоактивність при рівнях, у 5 разів вищих, ніж негативний контроль, розглядалися як позитивні.

#### Твердофазовий RIA CsRIA

rIL-18BP (5 мкг/мл) використовували як антиген, що захоплюється, і козячі антимишачі  $^{125}\text{I}$ -антитіла (100 мкл, 105 імп/хв) використовували для детектування. Блокування і промивання виконували, як описано вище. Позитивні клони додатково піддавали скринінгу за допомогою sRIA на їх

здатність пізнавати IL-18BP, виділений з концентрованої сечі людини (Novick et al. 1999). Мікروتитраційні планшети покривали IL-18BP сечі (1 мкг/мл), афінно очищеним за допомогою ліганду, блокували і промивали, як описано вище. Супернатанти гібридом (100 мкл) додавали, і детектування виконували з використанням козячих антимишачих  $^{125}\text{I}$ -антитіл ( $10^5$  імп/хв у 100 мкл).

sRIA для антитіл, специфічних відносно лігандзв'язувального сайту IL-18BP

Мікروتитраційні планшети покривали або виділеним з сечі IL-18BP (0,5 мкг/мл), або rIL-18BP (5 мкг/мл), блокували і промивали, як у sRIA. Додавали рекомбінантний IL-18 людини (50 мкл) до кінцевої концентрації 1,5 мкг/мл (15 хвилин при кімнатній температурі) з подальшим додаванням супернатантів гібридом (50 мкл). Детектування виконували з використанням козячих антимишачих  $^{125}\text{I}$ -антитіл ( $10^5$  імп/хв у 100 мкл, 2 години при кімнатній температурі).

Приклад 6 Вміст міокардіального IL-18 після LPS

Припускалося, що TNF $\alpha$  і IL-1 $\beta$  беруть участь у дисфункції серця під час сепсису. Оскільки IL-18 є прозапальним цитокіном, який, як відомо, опосередковує продукування TNF $\alpha$  і IL-1 $\beta$ , досліджували концентрацію IL-18 при LPS-індукованій дисфункції серця.

Мишей обробляли або носієм (фізіологічним розчином), або LPS. Серця збирали через 2, 4 і 6 годин після введення LPS і гомогенізували для визначення вмісту міокардіального IL-18 за допомогою ELISA (з набором, купленим у R&D Systems (Minneapolis MN)). Результати на фіг.9 показують дворазове збільшення вмісту IL-18 у міокарді через 4 години після введення LPS, що вказує на те, що IL-18 бере участь у дисфункції серця під час сепсису.

Приклад 7 Ефект нейтралізації IL-18 на LPS-індуковану дисфункцію міокарда

У попередньому прикладі було виявлене збільшення вмісту IL-18 при дисфункції серця, індукованій LPS. Таким чином, оцінювали ефект нейтралізації IL-18 на LPS-індуковану дисфункцію міокарда.

Функцію міокарда визначали ізоволюметричним, nereциркулюючим способом Лангендорфа, описаним раніше (Meng et al. 1998). Виділені серця перфузували нормотермічним розчином Кребса-Хензелята, що містить 11,0 моль/л глюкози, 1,2 моль/л CaCl<sub>2</sub>, 4,7 моль/л KCl, 25 моль/л NaHCO<sub>3</sub>, 119 моль/л NaCl, 1,17 моль/л MgSO<sub>4</sub> і 1,18 моль/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Балонний катетер з латексу вставляли у лівий шлуночок через ліве передсердя і наповнювали водою для одержання кінцевого діастолічного тиску лівого шлуночка (LVEDP) 10 мм рт. ст. Дроти, що задають ритм, приєднували до правого передсердя, і серця електростимулювали при 300 скороченнях за хвилину. Коронарний кровотік визначали кількісно збиранням ефлюенту з легених артерій. Температуру міокарда підтримували при 37°C. Тиск, що розвинувся, у лівому шлуночку (LVDP), його перші похідні (+dP/dt, -dP/dt) і кінцевий діастолічний тиск у лівому шлуночку (LVEDP)

безперервно реєстрували комп'ютеризованим чутливим до тиску підсилювачем-дигітайзером (MacLab 8, AD Instrument, Supertino, CA). Після 20-хвилинного періоду урівноважування визначали LVDP і  $\pm$  dP/dt при рівнях LVEDP, що варіюються, лівого шлуночка, (10, 15 і 20 мм рт. ст.)

Після введення LPS тиск, що розвинувся, лівого шлуночка (LVDP) зменшувався на 38% у порівнянні з контролями (фізіологічним розчином) (36,3  $\pm$  1,9 мм рт. ст. проти 59,1  $\pm$  1,9 мм рт. ст.,  $P < 0,001$ , фіг. 10). Передобробка мишей за 30 хвилин до введення LPS нормальною сироваткою кроликів (NRS) мала мінімальний вплив на LPS-індуковану дисфункцію серця; однак, передобробка нейтралізуючим IL-18 антитілом припиняла дисфункцію (фіг. 10). Коронарний кровотік не відрізнявся між даними групами (не показано).

Дані результати показують, що нейтралізація IL-18 захищає проти LPS-індукованої дисфункції міокарда.

Aestiz, M.E. and Rackow, E.G. (1998) "Septic shock" *THE LANCET* 351.1501-5.

Aiura, K., Gelfand, J.A., Burke, J.F., Thompson, R.C. and Dinarello, C.A. (1993) "Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist prevents Staphylococcus epidermidis-induced hypotension and reduces circulating levels of tumor necrosis factor and IL-1 beta in rabbits." *Infect Immun* 61,3342-50.

Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBoise, R.F., Cosman, D., Galibert, L. (1997) "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function." *Nature*, 390, 175-179.

Bazan, J. F., Timans, J.C. and Kaselein, R.A. (1996) "A newly defined interleukin-1?" *Nature* 379, 591.

Blumberg, R.S. and Strober, W. (2001) "Prospects for research in inflammatory bowel disease" *JAMA* 285, 643-7.

Cleveland, M.G., Gorham, J.D., Murphy, T.L., Tuomanen, E. and Murphy, K.M. (1996) "Lipoteichoic acid preparations of Gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway" *Infect Immun* 64, 1906-12.

Dinarello CA. (1996 ) "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* 87, 2095-147.

Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., (1994) "Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis." *Lancet* 344, 1125-1127.

Endo, S., Inada, K., Yamada, Y., Wakabayashi, G., Ishikura, H., Tanaka, T. and Sato, S. (2000) "Interleukin 18 (IL-18) levels in patients with sepsis." *J Med* 31, 15-20. Engelmann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D. and Wallach, D. (1989) "A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity" *J. Biol. Chem.* 264, 11974-11980.

Engelmann, H., Novick, D. and Wallach, D. (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.

Fiocchi, C. (1999) "From immune activation to gut tissue injury: the pieces of the puzzle are coming together." *Gastroenterology* 117, 1238-46.

Foss D.L., Zilliox M.J., Murtaugh M.P. (2001) "Bacterially induced activation of interleukin-18 in porcine intestinal mucosa." *Vet Immunol Immunopathol* 78, 263-77.

Ghayur, T., Banerjee, S., Huganin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D., and Alien, H. (1997) "Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production." *Nature* 386, 619-623.

Grantham, R. (1974) "Amino acid difference formula to help explain protein evolution" *Science* 185, 862-4.

Grobmyer, S.R., Lin, E., Lowry, S.F., Rivadeneira, D.E., Potter, S., Barie, P.S. and Nathan, C.F. (2000). "Elevation of IL-18 in human sepsis." *J Clin Immunol* 20, 212-5.

Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M.A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R.A., Sato, V.

Harding, M.W., Livingston, D.J., and Su, M.S. (1997) "Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1 beta converting enzyme." *Science* 275, 206-209.

Gupta, D., Kirkland, T.N., Viriyakosol, S. and Dziarski, R. (1996) "CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan." *J Biol Chem* 271, 23310-6.

Hachicha, M., Rathanaswami, P., Naccache, P.H. and McColl, S.R. (1998) "Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens." *J Immunol* 160, 449-54.

Henderson, B., Poole, S. and Wilson, M. (1996 ) "Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis." *Microbiol Rev* 60, 316-41.

Karp, C.L., Biron, C.A. and Irani, D.N. (2000) "Interferon  $\beta$  in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key?" *Immunology today* 21, 24-8.

Kim, S.H., Eisenstein, M., Reznikov, L., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstein, M. and Dinarello, C.A. (2000) "Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18." *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1190-5.

Kim, S.H., Reznikov, L.L., Stuyt, R.J., Selzman, C.H., Fantuzzi, G., Iloshino, T., Young, H.A. and Dinarello, C.A. (2001) "Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL-18R beta chain." *J Immunol* 166, 148-54.

Knaus, W.A., Harrell, F.E., Fisher, C.J. Jr, Wagner, D.P., Opal, S.M., Sadoff, J.C., Draper, E.A., Walawander, C.A., Conboy, K. and Grasela, T.H. (1993) "The clinical evaluation of new drugs for sepsis. A prospective study design based on survival analysis." *JAMA* 1993 270, 1233-41.

Knight, D.M., Trinh, H., Le, J., Siegel, S., Shealy, D., McDonough, M., Scallan, B., Moore, M.A., Vilcek and J., Daddona, P., (1993 ) "Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol*" 16, 1443-53.

Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. (1997) "IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of T<sub>H</sub>1 but not T<sub>H</sub>2 cells and exerts its effect independently of IL-12." *J. Immunol.* 158:1541-1550.

Liu, B., Novick, D., Kirn, S.H. and Rubinstein, M. (2000) "Production of a biologically active human interleukin 18 requires its prior synthesis as pro-IL-18 cytokine." *J. Immunol.* 164, 1519-1525.

Maliszewski, C.R., Sato, T.A., Vanden Bos, T., Waugh, S., Dower, S.K., Slack, J., Beckmann, M.P. and Grabstein K.H. (1990) "Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro." *J Immunol* 144, 3028-33.

Mariner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E. and Germann, T. (1993) "The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer." *Eur J Immunol* 23, 2202-8.

Muhl, H., Kampfer, H., Bosmann, M., Frank, S., Radeke, H. and Pfeilschifter J. (2000) "Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells." *Biochem Biophys Res Commun* Jan 267, 960-3.

Nakamura, K., Okamura, H., Wada, M., Nagata, K. and Tamura, T. (1989). "Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production." *Infect-Immun* 57, 590-5 issn: 0019-9567.

Nakamura, K., Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T. and Tumura, T. (1993) "Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production." *Infect. Immun.* 61, 64-70.

Nakamura, S., Otani, T., Ijiri, Y., Otsuda, R., Kurimoto, M. and Orita, K. (2000) "IFN- $\gamma$ -dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12. *The journal of Immunology* 164, 3330-6.

Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. (2001) "Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 responses depending on its cytokine milieu." *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 53-72.

Nathens A.B., Marshall J.C. (1996) "Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name?" *World JSurg* 20, 386-91.

Netea, M.G., Fantuzzi, G., Kullberg, B.J., Stuyt, R.J.L., Pulido, E.J., McIntyre, Jr. R.C., Joosten, L.A.B., Van der Meer, J.W.M. and Dinarello, C.A. (2000) "Neutralization of IL-18 reduces neutrophil tissue accumulation and protects mice against lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia" *The journal of immunology* 264:2644-2649.

Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. and Rubinstein, M. (1989) "Soluble cytokine receptors are present in normal human urine." *J. Exp. Med.* 170, 1409-14.

Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M. (1992) "Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids" *FEBS-Lett* 314, 445-8.

Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M. (1994) "The Human Interferon alpha/beta Receptor - Characterization and Molecular Cloning." *Cell* 77, 391-400.

Novick, D., Kim, S., Fantuzzi, G., Reznikov, L.L., Dinarello, C.A. and Rubinstein, M. (1999) "Interleukin-18 Binding Protein: A Novel Modulator of the T<sub>H</sub>1 Cytokine Response." *Immunity* 10, 127, 36.

Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S. and Kurimoto, M. (1995) "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." *Nature* 378, 88-91.

Okamura, H., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yoshimoto, T. and Nakanishi, K. (1998) "Regulation of IFN- $\gamma$  production by IL-12 and IL-18" *Current Opinion in immunology* 10, 259-264.

Okusawa, S., Gelfand, J.A., Ikejima, T., Connolly, R.J. and Dinarello, C.A. (1988) "Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition." *J Clin Invest* 81.1162-72.

Pomerantz, B.J., Reznikov, L.L., Harken, A.H. and Dinarello, C.A. (2001) "Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1 $\beta$ ." *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2871-6.

Puren, A.J., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A. (1999) "Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 $\beta$  are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells." *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 2256-61.

Sakao, Y., Takeda, K., Tsutsui, H., Kaisho, T., Nomura, F., Okazura, H., Nakanishi, K. and Akira S. (1999) "IL-18-deficient mice are resistant to endotoxin-induced liver injury but highly susceptible to endotoxin shock." *Int Immunol* 3, 471-80.

Seki, S., Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T., Hiraide, H. (2000) "The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses." *Immunol Rev* 174, 35-46.

Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, W.J. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density". *Cell*, 89, 309-19.

Skeen, M.J. and Ziegler, H.K., (1995) "Activation of gamma delta T cells for production of IFN-gamma is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12." *J Immunol.* 154, 5832-41.

Trinchieri, G. (1998) "Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity." *Adv Immunol* 70, 83-243.

Tripp, C.S., Wolf, S.F. and Unanue, E.R. (1993) "Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist." *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3725-9.

Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa and K. Kaneda.

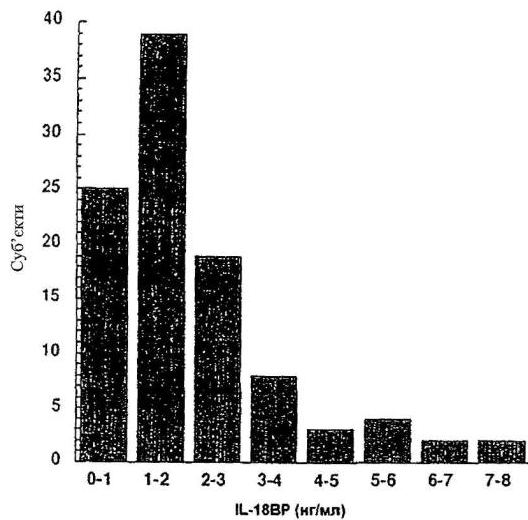


(1996) "IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of marine natural killer cell clones." *J. Immunol.* 157, 3967-73 issn: 0022-1767.

Urushihara, N., Iwagaki, H., Yagi, T., Kohka, H., Kobashi, K., Morimoto, Y.,

Yoshino, T., Tanimoto, T., Kurimoto, M., Tanaka, N. (2000) "Elevation of serum interleukin-18 levels and activation of Kupffer cells in biliary atresia." *J Pediatr Surg* 35, 446-9.

Ushio, S., Namba, M., Okura, T., Hattori, K., Nukada, Y., Akita, K., Tanabe, F., Konishi, K., Micallef, M., Fujii, M., Torigoe, K., Tanimoto, T., Fukuda, S., Ikeda, M., Okamura, H. and Kurimoto, M. (1996) "Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein." *J. Immunol.* 156, 4274-9.



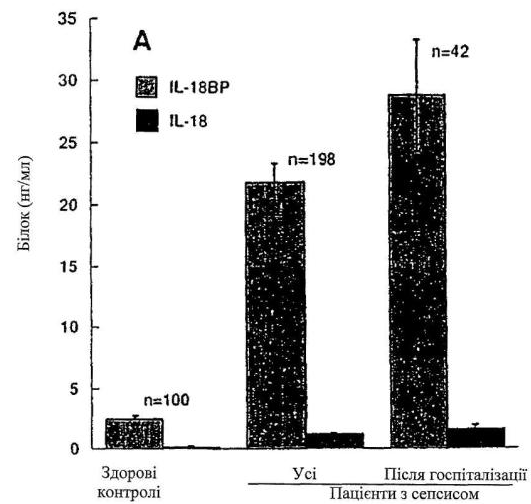
Фіг. 1

Vigers, G.P., Anderson, L.J., Gaffes, P., Brandhuber, B.J. (1997) "Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta." *Nature* 386, 190-4.

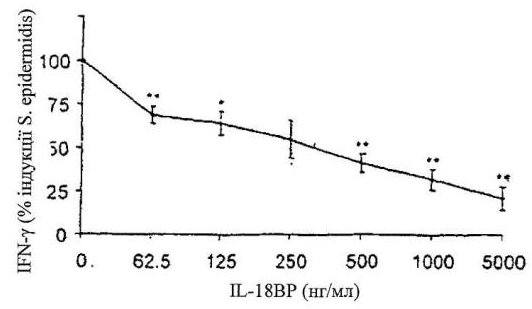
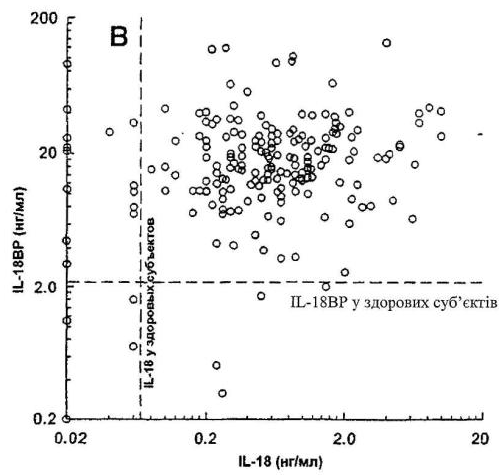
Xiang, Y. and Moss, B. (1999) "Identification of human and mouse homologs of the MC51L-53L-54L family of secreted glycoproteins encoded by the *Molluscum contagiosum* poxvirus." *Virology* 257, 297-302.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K. (1998) "Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro." *Endocrinology*, 139, 1329-37.

Посилання, що цитуються тут і у всьому описі, включені у вигляді посилань в їх повному обсязі.

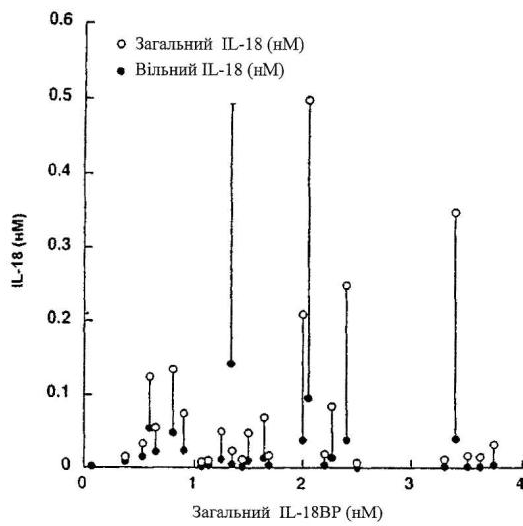


Фіг. 2А

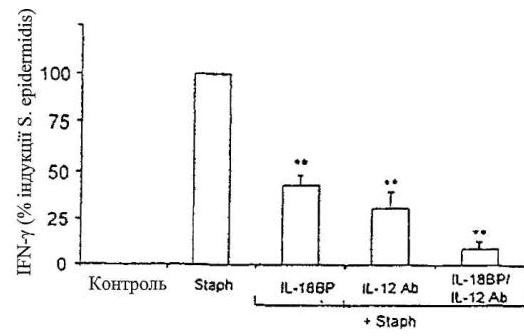


Фіг. 4

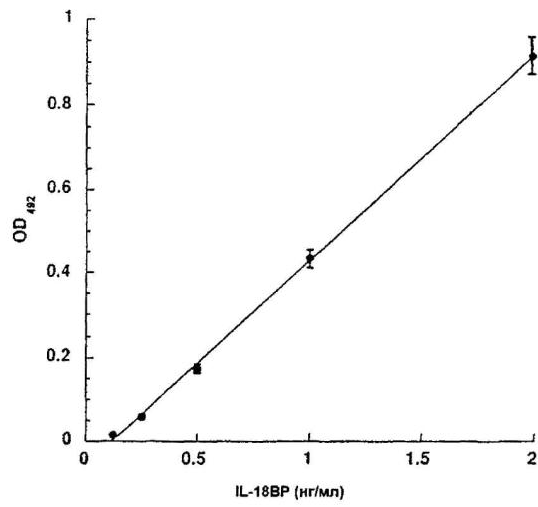
Фіг. 2В



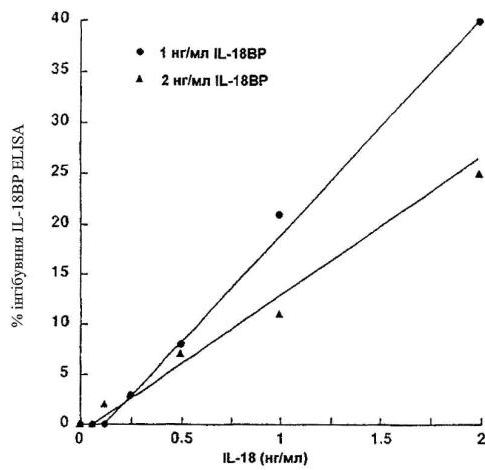
Фіг. 3



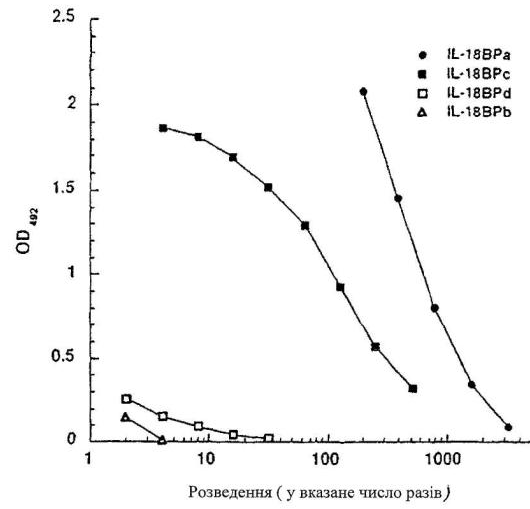
Фіг. 5



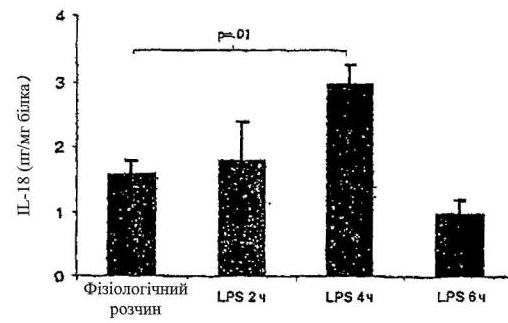
Фиг. 6



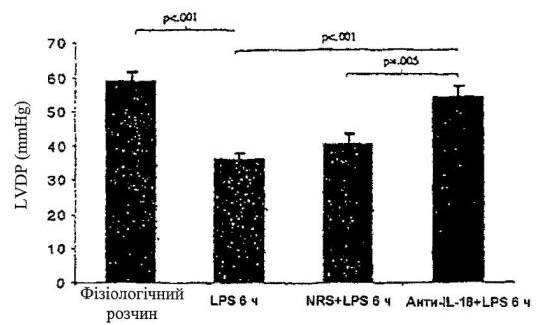
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

