



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96275** (13) **C2**

(51) **МПК**

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ІМУНОТЕРАПЕВТИЧНЕ ІНДУКУВАННЯ ЗВОРОТНОГО РОЗВИТКУ АТЕРОСКЛЕРОТИЧНИХ БЛЯШОК У ПАЦІЄНТІВ

1

2

(21) a200804022

(22) 04.09.2006

(24) 25.10.2011

(86) PCT/EP2006/008594, 04.09.2006

(31) 0517878.5

(32) 02.09.2005

(33) GB

(46) 25.10.2011, Бюл.№ 20, 2011 р.

(72) КАРЛССОН РОЛАНД, SE, НІЛЬССОН ЯН, SE

(73) БІОІНВЕНТ ІНТЕРНЕТІОНЛ АБ, SE

(56) SCHIOPU A ET AL: "RECOMBINANT HUMAN ANTIBODIES AGAINST ALDEHYDE-MODIFIED APOLIPOPROTEIN B-100 PEPTIDE SEQUENCES INHIBIT ATHEROSCLEROSIS" CIRCULATION, AMERICAN HEART ASSOCIATION, DALLAS, TX, US, vol. 110, no. 14, 5 October 2004 (2004-10-05), pages 2047-2052

NILSSON JAN ET AL: "Immunomodulation of atherosclerosis - Implications for vaccine development" ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 25, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 18-28

FREDRIKSON GUNILLA NORDIN ET AL: "Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences." ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY 1 MAY 2003, vol. 23, no. 5, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 879-884

(57) 1. Застосування щонайменше одного окисленого епітопа ApoB-100 або щонайменше одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ApoB-100 для індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок у особи.

2. Застосування за п. 1, де вказаний епітоп присутній в окисленому ApoB-100, але відсутній в нативному ApoB-100.

3. Застосування за п. 1, де епітоп ApoB-100 вибирається з пептидів, перелічених у Таблиці 1, або фрагмента, що містить щонайменше 6 послідовних амінокислотних залишків пептиду, переліченого в Таблиці 1.

4. Застосування за п. 1, де вказане антитіло є антитілом 2D03 або антитілом LDO D4.

5. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

6. Спосіб індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок у особи, що потребує цього, який включає введення особі:

(а) щонайменше одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ApoB-100, або

(б) щонайменше одного окисленого епітопа ApoB-100.

7. Спосіб за п. 6, де окислений епітоп ApoB-100 вибирають з пептидів, перелічених в Таблиці 1, або він є фрагментом, що містить щонайменше 6 послідовних амінокислотних залишків пептиду, перелічених в Таблиці 1.

8. Спосіб за п. 6 або 7, де окислений епітоп ApoB-100 включає епітоп, який був окислений шляхом експозиції з міддю або малоновим діальдегідом (MDA).

9. Спосіб за будь-яким з пп. 6-8, де антитіло є гуманізованим антитілом.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 6-9, де антитіло є фрагментом антитіла.

11. Спосіб за п. 10, де фрагмент антитіла є фрагментом одноланцюгового антитіла (scFv).

12. Спосіб за будь-яким з пп. 6-11, де особа є людською особою.

13. Спосіб за п. 12, де людська особа є особою з серцево-судинним захворюванням або ризиком розвитку серцево-судинного захворювання, пов'язаного з атеросклерозом.

14. Спосіб за п. 13, де серцево-судинне захворювання, пов'язане з атеросклерозом, вибирають з хвороби коронарних артерій, інфаркту міокарда і інсульту.

15. Спосіб за будь-яким з пп. 12-14, де людська особа є особою із запущеним або важким атеросклерозом або із запущеними або важкими фор-

C2
(13)

96275
(11)

UA
(19)

мами серцево-судинного захворювання, пов'язаного з атеросклерозом.

16. Спосіб за будь-яким з пп. 6-15, що додатково включає попередню стадію визначення розміру і/або кількості, і/або ступеня атеросклеротичних бляшок у особи.

17. Спосіб за будь-яким з пп. 6-16, що додатково включає подальший етап визначення ступеня зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок у особи.

18. Спосіб за п. 6, де антитіло є антитілом 2D03 або антитілом LDO D4.

19. Спосіб за будь-яким з пп. 6-18, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

20. Застосування (а) щонайменше одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ApoB-100, або (б) щонайменше одного окисленого епітопа ApoB-100, при одержанні лікарського засобу, що індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у особи.

21. Застосування за п. 20, де епітоп ApoB-100 вибирають із пептидів, перелічених у Таблиці 1, або він є фрагментом, що містить щонайменше 6 послідовних амінокислотних залишків пептиду, перелічених в Таблиці 1.

22. Застосування за п. 20 або 21, де окислений епітоп ApoB-100 включає епітоп, який був окислений шляхом експозиції з міддю або малоновим діальдегідом (MDA).

23. Застосування за будь-яким з пп. 20-22, де антитіло є гуманізованим антитілом.

24. Застосування за будь-яким з пп. 20-23, де антитіло є фрагментом антитіла.

25. Застосування за п. 24, де фрагмент антитіла є фрагментом одноланцюгового антитіла (scFv).

26. Застосування за будь-яким з пп. 20-25, де особа є людською особою.

27. Застосування за п. 26, де людська особа є особою із серцево-судинним захворюванням або ризиком розвитку серцево-судинного захворювання, пов'язаного з атеросклерозом.

28. Застосування за п. 27, де серцево-судинне захворювання, пов'язане з атеросклерозом, вибирають із хвороби коронарних артерій, інфаркту міокарда та інсульту.

29. Застосування за будь-яким з пп. 26-28, де людська особа є особою із запущеним чи тяжким атеросклерозом або із запущеними чи тяжкими формами серцево-судинного захворювання, пов'язаного з атеросклерозом.

30. Застосування за п. 20, де антитіло є антитілом 2D03 або антитілом LDO D4.

31. Застосування за будь-яким з пп. 20-30, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

32. Спосіб боротьби із серцево-судинним захворюванням, пов'язаним з атеросклерозом, який включає: індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок у особи шляхом введення особі (а) молекули щонайменше одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом

ApoB-100, або (б) щонайменше одного окисленого епітопа ApoB-100; і введення особі статину.

33. Спосіб за п. 32, де статин вибирається з аторвастатину, церивастатину, флувастатину, ловастатину, мевастатину, правастатину, розувастатину і симвастатину.

34. Спосіб за п. 32, де антитіло є антитілом 2D03 або антитілом LDO D4.

35. Спосіб за будь-яким з пп. 32-34, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

36. Застосування (а) молекули щонайменше одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ApoB-100, або (б) щонайменше одного окисленого епітопа ApoB-100, при одержанні лікарського засобу для боротьби із серцево-судинним захворюванням, пов'язаним з атеросклерозом, шляхом індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок, де особа є такою особою, якій вводиться статин.

37. Застосування за п. 36, де статин вибирається з аторвастатину, церивастатину, флувастатину, ловастатину, мевастатину, правастатину, розувастатину і симвастатину.

38. Застосування за п. 36, де антитіло є антитілом 2D03 або антитілом LDO D4.

39. Застосування за будь-яким з пп. 36-38, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

40. Застосування статину при одержанні лікарського засобу для боротьби із серцево-судинним захворюванням, пов'язаним з атеросклерозом, де особа є такою особою, якій для індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок вводиться (а) молекула щонайменше одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ApoB-100, або (б) щонайменше один окислений епітоп ApoB-100.

41. Застосування за п. 40, де статин вибирається з аторвастатину, церивастатину, флувастатину, ловастатину, мевастатину, правастатину, розувастатину і симвастатину.

42. Застосування за п. 40, де антитіло є антитілом 2D03 або антитілом LDO D4.

43. Застосування за будь-яким з пп. 30-42, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

44. Застосування (а) молекули щонайменше одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ApoB-100, або (б) щонайменше одного окисленого епітопа ApoB-100 і статину, при одержанні лікарського засобу для боротьби із серцево-судинним захворюванням, пов'язаним з атеросклерозом, шляхом індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок.

45. Застосування за п. 44, де статин вибирається з аторвастатину, церивастатину, флувастатину, ловастатину, мевастатину, правастатину, розувастатину і симвастатину.

46. Застосування за п. 44, де антитіло є антитілом 2D03 або антитілом LDO D4.

47. Застосування за будь-яким з пп. 44-46, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

48. Набір, який включає: (а) щонайменше одне антитіло, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ApoB-100, або (б) щонайменше один окислений епітоп ApoB-100; і статин, де кожен компонент надається у формі, придатній для введення в сполученні з іншими.

49. Набір за п. 48, де статин вибирається з аторвастатину, церивастатину, флувастатину, ловастатину, мевастатину, правастатину, розувастатину та симвастатину.

50. Набір за п. 48, де антитіло є антитілом 2D03 або антитілом LDO D4.

51. Набір за будь-яким з пп. 48-50, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

52. Спосіб ідентифікації антитіла, що індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у особи, який включає: надання антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ApoB-100, і тестування антитіла в аналізі на зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок в аналізі вказує, що антитіло є таким антитілом, яке індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок.

53. Спосіб за п. 52, де аналіз зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок є аналізом *in vivo*, з використанням тваринної моделі атеросклерозу.

54. Спосіб за будь-яким з пп. 52 або 53, де антитіло було виділене з бібліотеки фрагментів людських антитіл.

55. Спосіб за будь-яким з пп. 52-54, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

56. Спосіб ідентифікації агента, що індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок, який включає: надання агента, що містить окислений епітоп ApoB-100, введення агента особині, у якій є атеросклеротичні бляшки, і визначення того, чи індукує агент зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок вказує на те, що агент є агентом, який індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок.

57. Спосіб за п. 56, де визначення того, чи індукує агент зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок, включає аналіз *in vivo* з використанням тваринної моделі атеросклерозу.

58. Спосіб за п. 56, де визначення того, чи індукує агент зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок, включає тестування агента у людської особи, у якій є атеросклеротичні бляшки.

59. Спосіб за будь-яким з пп. 56-58, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок включає щонайменше 5%-е зменшення площі атеросклеротичних бляшок в аорті особи.

60. Застосування антитіла, вибраного з антитіла 2D03 або антитіла LDO D4, при одержанні лікарського засобу для індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок.

Область техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується імунотерапевтичних способів терапії серцево-судинного захворювання.

Рівень техніки

Атеросклероз є захворюванням, що залежить від багатьох факторів, яке розвивається переважно у суб'єктів, що демонструють біохімічні фактори ризику, які включають, поміж інших, паління, гіпертонію, цукровий панкреатичний діабет, гіперхолестеринемію, підвищений вміст у плазмі ліпопротеїдів низької густини (ЛПНГ) і тригліцеридів, гіперфібриногенемію та гіперглікемію. Атеросклероз є хронічним захворюванням, що викликає стовщення глибинного шару (інтими) артерій великого та середнього розміру. Це зменшує кровотік і може викликати ішемію та руйнування тканин в органах, живлення яких здійснюється uszkodженими судинами. Атеросклеротичні ураження розвиваються у людей протягом декількох десятиліть, приводячи до ускладнень, таких як коронарні та церебральні ішемічні та тромбоемболічні захворювання, і інфаркти міокарда та церебральних інфарктів.

Атеросклероз є головною причиною серцево-судинних захворювань, включаючи інфаркт міокарда, інсульт і захворювання периферичних артерій. Серцево-судинні захворювання є основною причиною захворюваності та смертності в промис-

лово розвинених країнах і безупинно прогресують у країнах, що розвиваються. Головною патологією, що лежить в основі захворювань, є коронарний атеросклероз. Сучасна терапія атеросклерозу не є повністю ефективною в запобіганні розвитку захворювання та ускладнень.

Захворювання виникає при накопиченні ліпопротеїдів, головним чином ЛПНГ, у позаклітинному матриксі судини. Дані частинки ЛПНГ агрегують і зазнають окисної модифікації. Окислені ЛПНГ токсичні та викликають uszkodження судин. Атеросклероз представляє, в багатьох аспектах, реакцію (включаючи запалення та фіброз) на дане uszkodження.

Високі рівні холестерину в плазмі, і особливо високі рівні ЛПНГ, звичайно вважаються рушійними силами розвитку атеросклерозу, у той час як високі рівні ліпопротеїдів високої густини (ЛПВГ) перешкоджають розвитку атеросклерозу.

Відповідно, ЛПВГ були названі гарним холестерином, у той час як ЛПНГ був названий поганим холестерином. Спрощено, ЛПВГ транспортують холестерин у тканині, у той час як ЛПНГ абсорбують холестерин із тканин і переносять їх у печінку, де відбувається їх деградація. Терапевтичні стратегії зменшення ЛПНГ і збільшення ЛПВГ для лікування атеросклерозу перебувають в процесі роз-

робки. Одна особливо цікава та перспективна стратегія включає мутований варіант ЛПВГ, так званий ApoA-1mпапо. Даний варіант ЛПВГ дуже ефективний в транспортуванні холестерину із тканин і в експериментах на тваринах (Shah et al., 1998), крім того, результати клінічних випробувань (Nissen et al., 2003) продемонстрували, що він може викликати значне зменшення відкладень атеросклеротичних бляшок.

Як було описано в розділі "Рівень техніки" патентної заявki WO02/080954, Palinski і співавтори (1989) виявили у людей циркулюючі антитіла до окислених ЛПНГ. Дане спостереження означало, що атеросклероз може бути аутоімунним захворюванням, викликаним імунними реакціями на окислені ліпопротеїни. Зараз кілька лабораторій почали пошук взаємозв'язку між титром антитіл до окислених ЛПНГ і серцево-судинними захворюваннями.

Було виявлено, що антитіла до окислених ЛПНГ присутні як у хворих із серцево-судинними захворюваннями, так і у здорових контрольних учасників дослідження. Це привело дослідників до вивчення того, чи дійсно аутоімунні реакції на окислені ЛПНГ у стінці судин відіграють певну роль у розвитку атеросклерозу, шляхом імунізації тварин до їх власних окислених ЛПНГ. Ідея, що лежить в основі даного підходу, полягала в тому, що якщо аутоімунні реакції на окислені ЛПНГ при використанні класичних методик імунізації будуть посилені, результатом цього буде збільшення судинного запалення та прогресування атеросклерозу. Для перевірки цієї гіпотези кроликів імунізували аутологічними окисленими ЛПНГ і потім індукували атеросклероз шляхом годування тварин дієтою з високим вмістом холестерину протягом 16 тижнів (Ameli et al., 1996; Freigang et al., 1998). Однак, на противагу вихідній гіпотезі, імунізація окисленими ЛПНГ чинила захисний ефект, зменшуючи розвиток атеросклерозу приблизно на 50 %. Аналогічні результати були також отримані в наступному дослідженні, у якому дієту з високим вмістом холестерину комбінували з ушкодженням судин за допомогою балона, який вводять усередину, для індукції більш активного утворення бляшок (Nissen et al., 1997). У сукупності, доступні дані означають, що існують імунні реакції, які захищають від розвитку атеросклерозу, і що ці реакції включають аутоімунні реакції проти окислених ЛПНГ.

Дані спостереження свідчать про можливості розробки імунної терапії або "вакцини" для лікування у людей серцево-судинних захворювань, що виникли на основі атеросклерозу. Одним зі способів здійснення такої терапії могла б стати імунізація особи власним ЛПНГ після його окислення, наприклад, при його контакті з міддю.

Palinski та співавтори (1995), і George та співавтори (1998) показали, що імунізація проти окислених ЛПНГ зменшує розвиток атеросклерозу. Аналогічно цьому, Zhou та співавтори (2001) продемонстрували, що антитіла, які реагують із епітопами, виявленими на окисленій формі ЛПНГ, на тваринних моделях захищають від розвитку атеросклерозу.

У заявці WO 02/080954 повідомляється, що вакцинація тварин, схильних до розвитку атеросклерозу, окисленими формами певних пептидів, отриманих з аполіпопротеїну B-100 (ApoB-100), захищає їх від розвитку атеросклерозу. Попередні експерименти продемонстрували, що антитіла, які зв'язуються з окисленими епітопами, присутніми в частинках ЛПНГ (Schiopu et al., 2004), у тваринних моделях чинять захисну дію проти розвитку атеросклеротичних бляшок. Більше того, мічені радіоактивним ізотопом форми антитіл, які зв'язуються з окисленими ЛПНГ, також можуть бути використані для радіоімунаналізу атеросклеротичних ушкоджень судин у експериментальних тварин (Tsimikas et al., 2000). Для детектування бляшок у мишей і кроликів було використане мічене I¹²⁵ антитіло до лізинового епітопу MDA, і було виявлено, що введені антитіла локалізуються в бляшках в аорті. Це вказує на те, що імунні реакції проти окислених ЛПНГ можуть чинити захисний ефект.

Також було показано, що рекомбінантні людські антитіла, вироблені проти MDA-модифікованих пептидів, отриманих з ApoB-100 людини, у відповідних тваринних моделях істотно інгібують утворення бляшок (Schiopu et al., (2004); заявка WO 2004/030607). Механізми, що лежать в основі дії на розростання бляшки, не відомі, однак припускається вплив на активацію макрофагів і запалення (Schiopu et al., 2004). Відомо, що окислені ЛПНГ активують макрофаги, що приводить до збільшеної запальної відповіді, яка, у свою чергу, індукує розвиток атеросклерозу (Smith et al., 1995). Однак не було ні теоретичних, ані експериментальних даних, які говорили б про те, що імунна відповідь проти окислених ЛПНГ або введення заздалегідь отриманих антитіл до окислених ЛПНГ, може в результаті дати зворотний розвиток вже існуючих атеросклеротичних ушкоджень.

У попередній роботі також було продемонстровано, що антитіла до окислених пептидів, отриманих з ApoB-100, так само як антитіла до інших окислених епітопів ЛПНГ, включаючи фосфатидилхолін, можуть запобігати розвитку атеросклеротичних бляшок у експериментальних тварин. (2004/030607; US6716410). Ін'єкція людських імуноглобулінів, що містять природні антитіла до окислених ЛПНГ, зменшувала атеросклероз у мишей з уродженою відсутністю ApoE (Nicoletti et al., 1998).

Наскільки нам відомо, ніхто з авторів будь-якої з даних публікацій не оцінив належним чином те, що антитіла до окислених епітопів ЛПНГ можуть викликати зменшення атеросклеротичних бляшок, вони не припускали, що подібні антитіла можуть бути використані у хворих людей для зменшення відкладень атеросклеротичних бляшок.

Розкриття винаходу

Дивним і несподіваним було те, що ми зараз виявили, що антитіла до окислених епітопів ЛПНГ не тільки дійсно перешкоджають утворенню бляшок, вони також індукують зменшення вже утворених атеросклеротичних бляшок. Такі антитіла можуть застосовуватися для терапії запущеного атеросклерозу для інтенсивного зворотного розви-

тку хвороби, що приведе до зменшення відкладень бляшок.

Аналогічно цьому, оскільки у ссавців титри специфічних антитіл можуть бути отримані як пасивною, так і активною імунізацією, зменшення вже існуючих бляшок може бути досягнуте за допомогою будь-якого з цих двох підходів.

Таким чином, даний винахід стосується застосування імунотерапії проти окислених ЛПНГ для індукування зменшення вже існуючих атеросклеротичних бляшок у людини.

Імунотерапія може бути або активною імунізацією при введенні окислених епітопів ЛПНГ, або пасивною імунізацією при введенні антитіл, індукованих проти окислених епітопів ЛПНГ.

У поняття "зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок" ми включаємо значення зменшення розміру та/або кількості та/або поширеності атеросклеротичних бляшок. В основному, зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок веде до зменшення площі внутрішньої поверхні артерії, покритої бляшками. Тому в поняття "зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок" ми включаємо зменшення сумарного відкладення бляшок у особини, а також зменшення розміру деяких або всіх атеросклеротичних бляшок особини. Зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок також веде до збільшення просвіту судин, що сприяє посиленню кровотоку.

Способи вимірювання розміру та/або кількості та/або поширеності атеросклеротичних бляшок у людини добре відомі фахівцям в даній області техніки та включають рентгенографію кровоносних судин, ультразвукове дослідження судин, комп'ютерну томографію та магнітну резонансну томографію.

У поняття "зменшення розміру та/або кількості та/або поширеності" ми включаємо зменшення приблизно на 1-25 %, наприклад, зменшення приблизно на 1, або 2, або 3, або 4, або 5 %, або більш значне зменшення приблизно на 6, або 7, або 8, або 9, або 10 %, або зменшення на 10-25 %. Кращим є більше зменшення на 25-50 %, або на 50-75 %, або ще більше зменшення.

Під зменшенням площі внутрішньої поверхні артерії, покритої атеросклеротичними бляшками, ми маємо на увазі зменшення приблизно на 1-25 %, наприклад, зменшення приблизно на 1, або 2, або 3, або 4, або 5 %, або більш значне зменшення приблизно на 6, або 7, або 8, або 9, або 10 %, або зменшення на 10-25 %. Кращим є більше зменшення на 25-50 %, або на 50-75 %, або ще більше зменшення.

У поняття ефективного поперечного перерізу артеріальної судини ми включаємо збільшення на 1-25 %, наприклад, збільшення приблизно на 1, або 2, або 3, або 4, або 5 %, або більш значне збільшення приблизно на 6, або 7, або 8, або 9, або 10 %, або збільшення на 10-25 %. Кращим є більше збільшення на 25-50 %, або на 50-75 %, або на 75-100 %. Кращим є збільшення ефективного поперечного перерізу артеріальної судини в 2, або 3, або 4, або 5, або в 10 разів, або ще більше збільшення. Очевидно, що ступінь збільшення поперечного перерізу артеріальної судини залежить від

рівня закупорки артерії, викликаного атеросклеротичними ушкодженнями до терапії.

Атеросклеротичні бляшки, які будуть регресувати, звичайно перебувають в аорті хворого, хоча також можуть бути виявлені в інших артеріях хворого, таких як стегнова, сонна та коронарна артерії.

Краще, якщо імунотерапія спрямована проти окислених епітопів, присутніх в окислених ЛПНГ, але не в нативних ЛПНГ. Подібні епітопи можуть бути визначені за допомогою методів, добрі відомих фахівцям в даній області техніки, і описаних у патенті WO 02/080954.

Ще краще, якщо імунотерапія спрямована проти окислених епітопів, присутніх в ApoB-100 в окислених ЛПНГ.

Окислені ЛПНГ містять кілька різних епітопів, які можуть розпізнаватися антитілами. ЛПНГ можуть піддаватися окисленню та деградації в широкому спектрі різних хімічних реакцій, які включають реакції, викликані різними видами модифікацій, спричинюваних активністю кисню, ферментів (наприклад, мієлопероксидази), іонів металу (наприклад, Fe^{2+} та Cu^{2+}), вільних радикалів та інших видів хімічного стресу.

Деякі з окислених епітопів виявлені в білковій частині ЛПНГ (Yang et al., 2001), однак інші епітопи є модифікаціями ліпідів, присутніх у частинці ЛПНГ. Може відбуватися утворення безлічі модифікованих окисленням і біологічно активних фосфоліпідів (Heery et al., 1995; Friedman et al., 2002; Watson et al., 1999). Поліненасичені жирні кислоти перетворюються на гідроперекиси жирних кислот, які швидко утворюють продукти з високою реакційною здатністю, такі як малоновий діальдегід та 4-гідроксиноненаль (Smiley et al., 1991). Цей вид проміжних продуктів може продовжувати перетворення на ковалентну основу Шифа та продукти реакції Майкла з лізином у білку в ApoB-100 із ЛПНГ. Реакційноздатні альдегіди також можуть бути виявлені в жирних кислотах, приєднаних через ефірні зв'язки в області фосфатидилхолінового залишку (Witztum & Berliner, 1998). Поширений фосфоліпід - 1-пальмітоїл-2-арахідоноїл-sn-гліцеро-3-фосфатидилхолін (ПАФХ) - близький до кінцевого продукт окислення, що дає альдегід на sn-2 атомі вуглецю окисленої арахідонової кислоти, в результаті чого утворюється ПОВФХ (1-пальмітоїл-2-(5-оксо)валероїл-sn-гліцеро-3-фосфатидилхолін).

ПОВФХ може реагувати з лізином, а також з фосфоліпідами, що містять аміни, такими як фосфатидилетаноламін і фосфатидилсерин. Кінцевий результат є безліччю окислених аддуктів ліпід-білок та окислених аддуктів ліпід-ліпід. Деякі із цих окислень каталізуються ферментами, такими як секреторна фосфоліпаза (Leitinger et al., 1999). Інші зміни, каталізовані ферментами, такі як нитрування та додавання HOCl , каталізує мієлопероксидаза (Carr et al., 2000). Вважається, що всі нові епітопи є імуногенними та біологічно активними (McIntire et al., 1999; Esterbauer et al., 1991). Також критичні епітопи, що є результатом окисної модифікації частинки ЛПНГ, які самі не окислені, як фосфатидилхолін і фрагменти білків, є відмітною озна-

кою окислених ЛПНГ, і подібні епітопи представляють вигідну мішень для імунотерапії.

Останнім часом автори даного винаходу з бібліотеки рекомбінантних фрагментів створили людські антитіла, названі n-CoDer®, які спрямовані проти окислених пептидів, отриманих з людського АроВ-100 (WO 02/080954). Дані пептидні епітопи АроВ-100, узяті з Таблиці 1 патентної заявки WO02/080954, перелічені нижче в Таблиці 1. Розроблені антитіла у тваринних моделях захищали від розвитку атеросклеротичних уражень (Schiopu

et al., 2004; патентна заявка WO 2004/030607). Послідовності антитіл проти окисленого АроВ-100, розкритих у патентній заявці WO 2004/030607, особливо IEI-A8, IEI-D8, IEI-E3, IEIG8, KTT-B8 та KTT-D6, включені в даний документ шляхом відсилання. Щоб уникнути непорозумінь, кожне з антитіл, описаних у заявці WO 2004/030607 та у роботі Schiopu et al., (2004), є прикладами антитіл, що можуть бути застосовані в контексті даного винаходу.

Таблиця 1

Назва пептиду	Амінокислотна послідовність пептиду	SEQ ID NO:
Категорія А. Високий титр IgG, відмінності по MDA (пептидах, модифікованих малоновим діальдегідом, та без нього)		
P11.		1
P25.		2
P74.		3
Категорія В. Високий титр IgM, відмінності по MDA відсутні		
P40.		4
P68.		5
P94.		6
P99.		7
P100.		8
P102.		9
P103.		10
P105.		11
P177.		12
Категорія С. Високий титр IgG, відсутні відмінності по MDA		
P143.		13
P210.		14
Категорія D.NHS/AHP IgG-ak>2, відмінності по MDA		
P 1.		15
P129.		16
P148.		17
P162.		18
P252.		19
Категорія Е. NHS/AHP IgM-ak>2, відмінності по MDA		
P301.		20
P30.		21
P31.		22
P32.		23
P33.		24
P34.		25
P100.		26
P107.		27
P149.		28
P169.		29
P236.		30
Категорія F.NHS/AHP IgG-ak<0,5, відмінності по MDA відсутні		
P10.		31
P45.		32
P111.		33
P154.		34
P199.		35
P222.		36
P240.		37
Категорія G. Титри антитіл IgG та IgM відсутні		
P2		38

Як показано вище в таблиці 1, пептиди можуть бути розділені по групах на 6 категорій із загальними характеристиками:

Категорія А: Фрагменти, які викликають високі титри антитіл IgG до пептидів, модифікованих MDA (малоновим діальдегідом) (n=3).

Категорія В: Фрагменти, які викликають високі титри антитіл IgM, але відсутні відмінності між нативними пептидами та пептидами, модифікованими MDA (n=9).

Категорія С: Фрагменти, які викликають високі титри антитіл IgG, але відсутні відмінності між нативними пептидами та пептидами, модифікованими MDA (n=2).

Категорія D: Фрагменти, які викликають високі титри антитіл IgG до пептидів, модифікованих MDA, і титри антитіл у пулі NHP, які були, щонайменше, у два рази вище, ніж титри антитіл у пулі AHP (n=5).

Категорія Е: Фрагменти, які викликають високі титри антитіл IgM до пептидів, модифікованих MDA, і титри антитіл у пулі NHP, які були, щонайменше, у два рази вище, ніж титри антитіл у пулі AHP (n=11).

Категорія F: Фрагменти, які викликають високі титри антитіл IgG, але відсутні відмінності між нативними пептидами та пептидами, модифікованими MDA, і титри антитіл у пулі AHP, які були, щонайменше, у два рази вище у порівнянні з титрами антитіл у пулі NHP (n=7).

Відомо, що пептидні фрагменти AроВ-100 можуть бути приготувані при використанні методик білкової хімії, наприклад, при використанні часткового протеолізу (як екзогенного, так і ендогенного), або за допомогою синтезу *de novo*. Як альтернативний варіант, варіанти можуть бути створені за допомогою технології на основі рекомбінантної ДНК. Відповідні методики для клонування, роботи, модифікації та експресії нуклеїнових кислот, а також очищення експресованих білків добре відомі в цій області техніки та описані, наприклад, в Sambrook et al. (2001) "Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3-є видання, Sambrook et al. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, яку включено в даний документ шляхом відсилання.

Поняття "пептид" включає не лише молекули, у яких амінокислотні залишки з'єднані пептидними зв'язками (-CONH-), але й молекули з оберненим пептидним зв'язком. Подібні пептиди, що копіюють, молекули з оберненим зв'язком (ретроенантіомери) можуть бути створені за допомогою методів, відомих у цій області техніки, наприклад, методів, описаних в Meziere et al., 1997. Даний підхід включає створення псевдопептидів, що містять зміни в кістяку молекули, але не в орієнтації бічних ланцюгів. Було показано, що дані псевдопептиди ефективні, щонайменше, у випадку відповідей ГКГС класу II і Т-хелперних клітин. Пептиди-ретроенантіомери, які містять зв'язки "-NH-CO-" замість пептидних зв'язків "-CO-NH-", більш стійкі до протеолізу. Аналогічно, пептидний зв'язок може бути зовсім відсутнім, за умови, що використовується відповідна линкерна ділянка, що фіксує простір між СІ атомами амінокислотних залишків;

особливо краще, якщо линкерна ділянка має в основному такий же розподіл заряду і в основному таку ж планарність, як і пептидний зв'язок. Також відомо, що пептид може бути блокований на N- або С-кінці, для того, щоб зменшити схильність до екзопроотеолітичного розщеплення.

Таким образом, даний винахід включає використання окислених пептидних епітопів AроВ-100, перелічених у Таблиці 1, або використання активного фрагмента одного чи більше з цих пептидів для імунотерапії проти окислених ЛПНГ для індукування зворотного розвитку вже існуючих атеросклеротичних бляшок, за допомогою активної імунізації або пасивної імунізації, а саме, введенням антитіл, індукованих проти даних окислених епітопів.

Відомо, що для вакцинації пептиди AроВ-100 можуть бути введені як в окислений, так і в неокислений формі, внаслідок того, що пептиди, як видно, окисляються при введенні *in vivo*. Тому в поняття "введення окисленого епітопа ЛПНГ" ми включаємо введення неокисленого епітопа, який стає окисленим *in vivo*.

Щоб уникнути непорозуміння, у контексті даного винаходу всі антитіла для пасивної імунізації зв'язуються з окисленими ЛПНГ.

У поняття "фрагмент" пептидного епітопа AроВ-100, включеного в Таблицю 1, ми включаємо, щонайменше, 6 послідовних амінокислот даної послідовності. Таким чином, фрагмент може містити 6, або 7, або 8, або 9, або 10, або 11, або 12, або 13, або 14, або 15, або 16, або 17, або 18, або 19 послідовних амінокислот даної послідовності. "Активним" називається фрагмент, що в окисленому стані може бути використаний для індукції антитіл, які індукують зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у людини в результаті активної імунізації або пасивної імунотерапії. Способи визначення того, чи є той чи інший фрагмент пептидних епітопів, перелічених у Таблиці 1, активним, представлені в Прикладах.

В одному аспекті даного винаходу, імунотерапія включає введення особині, щонайменше, одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ.

Таким чином, даний винахід включає спосіб індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок у людини, що потребує цього, який включає введення хворому, щонайменше, одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ.

Даний винахід також включає застосування, щонайменше, одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, у препараті лікарського засобу, що індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у людини.

У втіленні даного винаходу, введення антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, включає введення особині полінуклеотиду, що кодує зазначену молекулу антитіла.

Способи введення полінуклеотидів пацієнтам добре відомі фахівцям в даній області техніки та включають застосування імуноліпосом, вірусних векторів (включаючи вакцинні, модифіковані вакцинні та аденовіруси) і прямої доставки ДНК, напри-

клад, при застосуванні генної гармати та електропорації. Наприклад, Svensson et al., 1999, описує доставку рекомбінантних генів у кардіоміоцити за допомогою ін'єкції усередину міокарда або інфузією у коронарну судину кардіотропних векторів, таких як рекомбінантні аденоасоційовані вірусні вектори, результатом чого була експресія трансгена в кардіоміоцитах миші *in vivo*. Melo et al., 2004, опублікували огляд з генної та клітинної терапії серцевих захворювань. Альтернативний кращий шлях введення - введення через катетер або стент. Стенти надають привабливу альтернативу для локального трансгенозу, оскільки вони забезпечують платформу для пролонгованого вивільнення гена та ефективної трансдукції артеріальних стінок. Дана стратегія перенесення генів має потенціал для зменшення системного поширення вірусних векторів, внаслідок чого відбувається зменшення імунної відповіді хазяїна. Як для синтетичних, так і для природних оболонок стентів була показана можливість забезпечення пролонгованого вивільнення гена без значних побічних реакцій (Sharif et al., 2004).

Краще, якщо полінуклеотид, що кодує молекулу антитіла, функціонально зв'язаний із адресуючою та/або регуляторними послідовностями, які спрямовують експресію антитіл в артерії, і бажано в артеріальні стінки. Таким чином, полінуклеотид уможливорює утворення специфічних антитіл усередині хворої людини. Відповідні послідовності для адресування та регуляції відомі фахівцям.

Може виявитися бажаним вміння регулювати експресію полінуклеотиду у клітині в часі. Тому може виявитися бажаним, щоб експресія полінуклеотиду перебувала прямо або опосередковано (дивися нижче) під контролем промотору, який міг би регулюватися, наприклад, концентрацією невеликої молекули, яку можна було б вводити хворому, коли буде необхідно активувати або, що більш імовірно, репресувати (залежно від того, чи діє невелика молекула на активацію або на репресію згаданого промотору) експресію антитіла, кодового полінуклеотидом. Це може бути особливо зручно, якщо експресія конструкції стаціонарна, тобто з конструкції антитіла можуть експресуватися (у присутності будь-якої необхідної з регуляторних молекул) у клітині протягом періоду, рівного, щонайменше, одному тижню, одному, двом, трьом, чотирьом, п'яти, шести, восьми місяцям або одному чи більше рокам. Таким чином, полінуклеотид може бути функціонально зв'язаний з регульованим промотором. Приклади регульованих промоторів включають промотори, згадані в таких статтях: Rivera et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96(15), 8657-62 (контроль за допомогою рапаміцину - біологічно доступних ліків, що приймаються перорально, застосування двох різних аденовірусних або аденоасоційованих (AAV) вірусних векторів, один з яких кодує ген-мішень індукбельного людського гормону росту (hGH), а інший кодує регульований рапаміцином фактор транскрипції, що складається із двох частин); Magari et al. (1997) *J Clin Invest* 100(11), 2865-72 (контроль за допомогою рапаміцину); Bueler (1999) *Biol Chem* 380(6), 613-22 (огляд аденоасоційованих

вірусних векторів); Bohl et al. (1998) *Blood* 92(5), 1512-7 (контроль доксицикліном в аденоасоційованому вірусному векторі); Abruzzese et al. (1996) *J Mol Med* 74(7), 379-92 (огляд факторів індукції, наприклад, гормонів, факторів росту, цитокінів, цитостатичних засобів, радіації, теплового шоку та асоційованих чутливих елементів).

У кращому втіленні, молекула антитіла є анти тілом, індукованим проти окисленого епітопа ЛПНГ, такого, наприклад, як епітопів, перелічених у Таблиці 1 і патенті WO 02/080954. Як докладно описано у патенті WO 02/080954, пептиди можуть бути окислені при контакті з безліччю агентів, таких як залізо, кисень, мідь, мієлопероксидаза, фосфоліпаза, хлорноватиста кислота або при модифікації малоновим діальдегідом (МДА) для імітування різних модифікацій амінокислотних залишків, що можуть відбуватися під час окислення ЛПНГ. Як альтернативні для окислення епітопів ЛПНГ можуть бути використані інші способи, відомі в цій області техніки.

Вироблення людських антитіл, що реагують із пептидами, отриманими з ApoB-100 і модифікованими МДА, була описана в патенті WO 02/090854 та у роботі Schioru et al., 2004. Як більш докладно обговорюється нижче, людські або схожі на людські антитіла також можуть бути отримані при застосуванні інших технологій, добрі відомі у цій області техніки, включаючи імунізацію мишей, трансгенних по локусу людського імуноглобуліну, або шляхом гуманізації, наприклад, мишачих антитіл з потрібною специфічністю.

Під антитілом, що "селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ" ми маємо на увазі те, що молекула антитіла зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ із більшою спорідненістю, ніж з неокисленим ЛПНГ. Краще, антитіло зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, щонайменше, в 1, 5, або, щонайменше, в 2, або, щонайменше, в 5, або, щонайменше, в 10, або, щонайменше, в 50 разів з більшою спорідненістю, ніж з неокисленим ЛПНГ.

Ще краще, щоб молекула антитіла зв'язувала окислений епітоп ЛПНГ зі спорідненістю, щонайменше, в 100 або, щонайменше, в 1000, або, щонайменше, в 10000 разів вище, ніж неокислений ЛПНГ. Таке зв'язування можна виміряти з використанням методів, добрі відомі в даній області, таких як система Biacore®. Краще, щоб молекула антитіла селективно зв'язувала окислений епітоп ЛПНГ і не зв'язувала неокислений ЛПНГ.

Краще, якщо антитіла мають спорідненість до епітопу-мішені, принаймні, 10^{-8} М, хоча антитіла з більшою спорідненістю можуть виявитися навіть кращими.

Відомо, що захисні ефекти людського імунітету опосередковуються сімейством молекул зі структурною спорідненістю, які називаються антитілами. Антитіла виявляють свою біологічну активність при зв'язуванні з антигенами. Зв'язування антитіл з антигенами звичайно є специфічним для одного антигену, і зв'язування звичайно відбувається з високою спорідненістю. Антитіла виробляються В-лімфоцитами. У крові міститься багато різних антитіл, кожне з яких виробляється клоном В-клітин і має відмінну структуру та специфічність по відно-

шенню до антигену. Антитіла присутні на поверхні В-лімфоцитів, у плазмі крові, у тканинній рідині тканин та у секреторних рідинах, таких як слина та слиз на слизових поверхнях. Всі антитіла, що зустрічаються в природі, мають подібну загальну структуру, що відповідає за певну схожість фізико-хімічних властивостей, таких як заряд і розчинність. Всі антитіла мають загальну центральну структуру із двох ідентичних легких ланцюгів, з масою кожного ланцюга близько 24 кілодальтон, і двома ідентичними важкими ланцюгами з молекулярною масою кожного ланцюга, приблизно рівною 55-70 кілодальтон. Один легкий ланцюг прикріплений до кожного важкого ланцюга, і два важкі ланцюги, з'єднані разом. І легкий, і важкий ланцюг містять серію повторюваних гомологічних одиниць, кожна приблизно в 110 амінокислотних залишків довжиною, які незалежно згортаються в загальний глобулярний мотив, називаний імуноглобуліновим (Ig) доменом. Ділянка антитіла, сформована при з'єднанні двох важких ланцюгів, є гідрофобною. Відомо, що антитіла, і особливо моноклональні антитіла, коли зазнають впливу несприятливих фізичних або хімічних умов, розщеплюються в ділянці, де легкі ланцюги приєднуються до важких ланцюгів. Оскільки антитіла містять безліч залишків цистеїну, вони можуть утворювати цистеїн-цистеїнові дисульфідні зв'язки. Всі Ig домени містять два шари бета-складок із трьома або чотирма тяжами антипаралельних поліпептидних ланцюжків.

Незважаючи на загальну подібність, молекули антитіл можуть бути розділені на невелике число різних класів і підкласів на основі фізико-хімічних властивостей, таких як розмір, заряд і розчинність, і по їх поведінці при зв'язуванні з антигенами. У людей присутні такі класи молекул антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, про членів кожного класу говорять, що вони належать до одного ізотипу. Ізотипи IgA та IgG далі підрозділяються на підкласи, називані IgA1, IgA2 та IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4. Важкі ланцюги всіх антитіл одного ізотипу мають великі регіони з ідентичною амінокислотою послідовністю, але відрізняються від важких ланцюгів антитіл, що належать до інших ізотипів або підкласів. IgG, IgE та IgD циркулюють у вигляді мономерів, у той час як секретовані форми IgA та IgM є димерами або пентамерами, відповідно, які стабілізуються J-ланцюгом. Деякі молекули IgA існують у вигляді мономерів або тримерів.

У поняття "антитіло" або "молекули антитіла" ми включаємо не тільки цілі молекули імуноглобуліну, які описані вище, але також фрагменти молекул, такі як Fab, F(ab')₂, Fv та інші фрагменти молекул імуноглобулінів, які зберігають антигензв'язуючу ділянку. Аналогічно, термін "антитіло" включає похідні антитіл, отримані за допомогою генної інженерії, такі як молекули з одним ланцюгом Fv (scFv) і доменні антитіла (dAbs). Даний термін також включає антитілоподібні молекули, які можуть бути отримані із застосуванням технології фагових дисплеїв або інших технологій випадкового відбору для молекул, що зв'язуються з окисленими ЛПНГ або з їх специфічними ділянками. Тому термін "антитіло" включає всі молеку-

ли, які містять структуру, бажано пептидну структуру, що є частиною сайту впізнавання природного антитіла (тобто частина антитіла, що зв'язується або з'єднується з епітопом або антигеном).

У розпізнаванні антигену беруть участь варіабельні домени важких (V_H) і легких (V_L) ланцюгів антитіла, цей факт був уперше визнаний у ранніх експериментах з розщеплення протеазами. Подальше підтвердження було виявлено при "гуманізації" антитіл гризунів. Варіабельні домени антитіл гризунів можуть бути злиті з константними доменими антитіл людини так, що отримане в результаті антитіло зберігає антигенну специфічність батьківського антитіла гризуна (Morrison et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81,6851-6855). З експериментів по експресії в бактеріях фрагментів антитіл, що містять один чи більше варіабельних доменів, відомо, що антигенна специфічність визначається варіабельними доменими та не залежить від константних доменів. Дані молекули включають Fab-подібні молекули (Better et al. (1988) *Science* 240,1041); молекули Fv (Scerra et al. (1988) *Science* 240,1038); одноланцюгові молекули Fv (scFv), де домени-партнери V_H та V_L з'єднані гнучким олігопептидом (Bird et al. (1988) *Science* 242,423; Huston et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85,5879), і антитіла з одним доменом (dAbs), що включають ізольовані V-домени (Ward et al. (1989) *Nature* 341,544). Загальний огляд методів, застосовуваних для синтезу фрагментів антитіл, які включають їх специфічні ділянки зв'язування, можна знайти в роботі Winter & Milstein (1991) *Nature* 349, 293-299.

Під терміном "ScFv-молекули" ми маємо на увазі молекули, у яких домени-партнери V_H та V_L з'єднані гнучким олігопептидом. Сконструйовані антитіла, такі як ScFv-антитіла, можуть бути створені за допомогою технологій і підходів, описаних в роботі J.Huston et al. (1988) "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *E.coli*", *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, pp.5879-5883, і в A.Pluckthun, (1991) "Antibody engineering; Advances from use of *E.coli* expression systems", *Biootechnology* 9(6): 545-51, включені в даний документ шляхом посилання.

Переваги використання фрагментів антитіл у порівнянні з використанням цілих антитіл вищі в кілька разів. Менший розмір фрагментів може приводити до поліпшених фармакологічних властивостей, таких як краще проникнення до місця-мішені. Усуваються ефекторні функції антитіл, такі як зв'язування комплексу. Фрагменти Fab, Fv, scFv та dAb можуть бути експресовані *E. coli* і секретуються бактеріями, що дає можливість легко виробляти великі кількості даних фрагментів.

Цілі антитіла та фрагменти F(ab')₂ є "бівалентними". Під визначенням "бівалентний" ми маємо на увазі те, що антитіла та фрагменти F(ab')₂ мають два сайти об'єднання з антигеном. Навпроти, фрагменти Fab, Fv, scFv та dAb є моновалентними, вони мають тільки одну ділянку об'єднання з антигеном.

Краще, щоб антитіло було моноклональним антитілом. При деяких обставинах, особливо якщо

антитіло планується вводити людині-пацієнтові багаторазово, краще, щоб антитіло було людським моноклональним антитілом або гуманізованим моноклональним антитілом.

Придатні моноклональні антитіла, які реагують так, як описано в даному документі, можуть бути приготовлені за допомогою відомих технологій, наприклад, розкритих в "Monoclonal Antibodies; A manual of techniques", H.Zola (CRC Press, 1988) або в "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application", SGR Hurrell (CRC Press, 1982).

Антитілам можна надавати бажані властивості, що стосуються, наприклад, специфічності та перехресної реактивності, ізотипу, спорідненості та часу напівжиття в плазмі крові. Можливість розробки антитіл із заданими властивостями стала очевидною вже при створенні технології одержання моноклональних антитіл (Milstein and Kohler, 1975, *Nature*, 256:495-7). В даній технології використовуються мишачі клітини гібридами, що продукують великі кількості ідентичних, але мишачих, антитіл. Дійсно, величезну кількість доклінічних, а також клінічних випробувань було почато із застосуванням мишачих моноклональних антитіл для терапії, наприклад, злоякісних новоутворень. Однак, внаслідок того, що антитіла були не людського походження, імунна система пацієнтів розпізнавала їх як чужорідні та виробляла до них антитіла. Внаслідок цього ефективність і час напівжиття в плазмі крові мишачих антитіл знижувалися, і часто побічні ефекти від алергійних реакцій, викликаних чужорідним антитілом, перешкоджали успішному лікуванню.

Для вирішення цих проблем, для зменшення мишачого компонента специфічних і потенційно терапевтичних антитіл, було здійснено кілька підходів. Перший підхід був технологією створення так званих химерних антитіл, у яких мишачі варіабельні домени були перенесені на людські константні ділянки, в результаті чого було отримане антитіло, яке було в основному людського походження (Neuberger et al., 1985, *Nature* 314:268-70; Neuberger et al., 1998, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799).

Подальшим удосконаленням даного підходу була розробка гуманізованих антитіл, у яких ділянки мишачих антитіл, що контактують із антигеном, гіперваріабельні ділянки (CDRs) були перенесені в конструкцію людського антитіла. Подібні антитіла виходять майже повністю людськими, і при введенні пацієнтам рідко викликають які-небудь шкідливі імунні відповіді. Кілька химерних або гуманізованих антитіл були зареєстровані як терапевтичні ліки і зараз широко застосовуються при різних показаннях (Borrebaeck & Carlsson, 2001, *Curr. Opin. Pharmacol.* 1:404-408).

Краще, якщо антитіло є гуманізованим антитілом. Отримані відповідним чином антитіла можуть бути "гуманізовані" відовими способами, наприклад, вставкою CDR-ділянок мишачих антитіл в конструкцію людського антитіла. Гуманізовані антитіла можуть бути приготовлені із застосуванням технологій і підходів, описаних в Verhoeven et al. (1988) *Science*, 239, 1534-1536, і в Kettleborough et al. (1991) *Protein Engineering*, 14(7), 773-783.

Антитіла, що є повністю людськими, можуть бути вироблені при використанні технології одержання рекомбінантних антитіл. Звичайно використовуються великі бібліотеки, що містять мільярди різних антитіл. На відміну від попередніх технологій, що використовують створення химерних або гуманізованих мишачих антитіл, дана технологія не основана на імунізації тварин для одержання специфічних антитіл. Замість цього використовуються рекомбінантні бібліотеки, що містять величезне число вже готових варіантів антитіл, при цьому імовірно, що бібліотека буде містити, щонайменше, одне антитіло для будь-якого антигену. Таким чином, при використанні цих бібліотек може бути ідентифіковане вже наявне антитіло, що має необхідні характеристики зв'язування. Для того щоб ефективно знаходити в бібліотеці антитіло з гарними характеристиками зв'язування, були розроблені різні системи, де фенотип, тобто антитіло або його фрагмент, зчеплений з його генотипом, тобто кодуєчим геном.

Найбільш часто використовуваною системою є так називана система фагового дисплея, де фрагменти антитіла експресуються і експонуються, як злитий білок, з поверхневими білками фага на поверхні частинок ниткоподібного бактеріофага, при цьому фаг одночасно несе генетичну інформацію, що кодує дану молекулу (McCafferty et al., 1990, *Nature* 348: 552-554). Фаг, що експонує фрагменти антитіла, специфічного для певного антигену, може бути відібраний шляхом зв'язування з антигеном, про який мова йде. Відібраний фаг потім може бути ампліфікований, і ген, що кодує варіабельні домени відібраного антитіла, може бути при бажанні перенесений в інші формати антитіл, такі як, наприклад, повноланцюговий імуноглобулін, і експресований в великих кількостях із застосуванням відповідних векторів і клітин-хазяїв, які добре відомі в цій області техніки.

Формат станів, експонованих на фагових частинках антитіл, може відрізнятися. Найбільш часто використовуваними форматами є Fab (Griffiths et al., 1994 *EMBO J.* 13: 3245-3260) і одноланцюгові фрагменти (scFv) (Hoogenboom et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388), обидва формати містять варіабельні домени антитіл, які зв'язують антиген. Одноланцюговий формат складається з варіабельного домену важкого ланцюга (V_H), приєднаного до варіабельного домену легкого ланцюга (V_L) за допомогою гнучкого лінкера (US4946778). Перед застосуванням як терапевтичний агент, антитіло може бути переведене в розчинний формат, наприклад, Fab або scFv, та аналізовано в такому виді. На більш пізніх етапах ідентифікований фрагмент антитіла, що має бажані характеристики, може бути перенесений в інші нові формати, такі як повнорозмірні антитіла.

Недавно була представлена нова технологія для генерації розмаїтості в бібліотеках антитіл (патент WO 98/32845; Soderlind et al., 2000) *Nature Biotechnol.* 18:852-856). Всі фрагменти антитіл, отримані із цієї бібліотеки, мають однакові ділянки каркаса, і відрізняються тільки по CDR. Оскільки ділянки каркасів належать до зародкової послідовності, очікується, що імуногенність антитіл, отри-

маних з даної бібліотеки, або аналогічних бібліотек, отриманих при застосуванні тієї ж технології, буде особливо низькою (Soderlind et al., 2000). Дана властивість має велику цінність для терапевтичних антитіл, оскільки зменшує ризик того, що у пацієнта будуть утворюватися антитіла до введених антитіл, у такий спосіб зменшується ризик виникнення алергійних реакцій, наявності блокуючих антитіл, і забезпечується тривалий час напівжиття антитіл у плазмі.

Тому при розробці терапевтичних антитіл, які буде використані на людях, зараз застосовується сучасна технологія бібліотек рекомбінантних ДНК (Soderlind et al., 2001, Comb. Chem. & High Throughput Screen. 4: 409-416), а не більш рання гібридомна технологія.

Відомо, що пептиди, ідентифіковані в патентній заявці WO 02/080954 і перелічені в Таблиці 1, можуть бути використані як антигени для генерації повністю людських антитіл із заздалегідь заданими властивостями, що можуть бути особливо значущими як терапевтичні антитіла для індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок. Очікується, що отримані повністю людські антитіла

не будуть викликати яких-небудь небажаних імунологічних реакцій при введенні пацієнтам.

Деякі кращі антитіла включають антитіла, що зв'язуються з епітопами ApoB-100 P45 (амінокислотні залишки 661-680) та/або P143 (амінокислотні залишки 2131-2150). Антитіла, що мають дану зв'язуючу специфічність, включають IEI-I3 (Schiopu et al., 2004) і 2D03 (описано в прикладі 2).

Раніше було показано, що антитіло IEI-E3 у значній мірі інгібує розвиток бляшок у тваринних моделях (Schiopu et al., 2004). Ми продемонстрували (див. Приклади), що воно може індукувати зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок. Ми також продемонстрували, що всі інші антитіла до окислених ЛПНГ із різною специфічністю, а саме, 2D03, LDO-D4 і KTT-B8, але не контрольне антитіло FITC-8, могли значно зменшувати рівень бляшок в аорті в порівнянні із площею бляшок, спостережуваною у тварин до початку терапії. CDR-послідовності антитіл перелічені в Таблиці 2. Послідовності V_H та V_L антитіл IEI-E3 і KTT-B8 представлені на Малюнку 3 патентної заявки WO 2004/030607 і включені в даний документ шляхом відсилання.

Таблиця 2

Амінокислотні послідовності CDR, виявлені в антитілах до окислених ЛПНГ.

	2D03	LDO-D4	IEI-E3	KTT-B8
H1	FSNAWMSWVRQAPG (SEQ ID No:39)	FSNAWMSWVRQAPG (SEQ ID No:45)	FSDYYMSWVRQAPG (SEQ ID No:51)	FSSYAMSWVRQAPG (SEQ ID No:57)
H2	SSISVGGHRTYYADSV KGR (SEQ ID No:40)	SSISTSSNYIYYADSVK GR (SEQ ID No:46)	SGVSWNGSRTHYADS VKGR (SEQ ID No:52)	SSISSSGRFIYYADSM KGR (SEQ ID No:58)
H3	ARIRVGPSGGARDY (SEQ ID No:41)	ARVKKYSSGWYSNYA FDI (SEQ ID No:47)	ARAARYSYYYGMDV (SEQ ID No:53)	TRLRRGSYFWAFDI (SEQ ID No:59)
L1	CSGSNTNIGKNYVS (SEQ ID No:42)	CSGSSSSIGNNFVS (SEQ ID No:48)	CSGSSSNIGNNAVN (SEQ ID No:54)	CSGSSSNIGGESVS (SEQ ID No:60)
L2	ANSNRPS (SEQ ID No:43)	DNNKRPS (SEQ ID No:49)	GNDRRPS (SEQ ID No:55)	SNNQRPS (SEQ ID No:61)
L3	CASWDASLNGWV (SEQ ID No:44)	CAAWDDSLNGWV (SEQ ID No:50)	CQTWGTGRGV (SEQ ID No:56)	CAAWDDSLNGWV (SEQ ID No:62)

В іншому аспекті даного винаходу, імунотерапія включає введення особині, щонайменше, одного окисленого епітопа ЛПНГ. Цей щонайменше один окислений епітоп ЛПНГ впливає на індукцію імунної відповіді проти окисленого епітопа таким чином, щоб індукувати зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у хворого. Інакше кажучи, щонайменше, один окислений епітоп ЛПНГ діє як вакцина, що індукує імунну відповідь, яка індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у вакцинованої особини.

Таким чином, даний винахід включає спосіб індукції зворотного розвитку (регресії) атеросклеротичних бляшок у індивідуума, що потребує цього, який включає введення індивідууму, щонайменше, одного окисленого епітопа ЛПНГ.

Таким чином, даний винахід включає, щонайменше, один окислений епітоп ЛПНГ у препараті лікарського засобу для індукування зворотного

розвитку атеросклеротичних бляшок у вакцинованої особини.

В основному, особина є ссавцем, таким як кінь, корова, вівця, свиня, верблюд, собака або кішка. Краще, якщо особина є людиною.

Людина звичайно є пацієнтом, що має серцево-судинне захворювання, пов'язане з атеросклерозом, або ризик виникнення такого захворювання. Термін "серцево-судинне захворювання, пов'язане з атеросклерозом" включає посилення на хвороби, які з медичної точки зору пов'язані з атеросклерозом таким чином, що вони є наслідком атеросклеротичних уражень. Серцевосудинні захворювання, пов'язані з атеросклерозом, які повинні бути згадані, включають хворобу коронарних артерій, інфаркт міокарда та інсульт.

Чи зможе той або інший пацієнт одержати користь від терапії, визначає лікар.

Відомо, що оскільки способи та застосування даного винаходу ведуть до зворотного розвитку

вже існуючих атеросклеротичних бляшок, даний винахід включає зменшення ризику серцево-судинного захворювання, пов'язаного з атеросклерозом, у хворого, для якого існує ризик розвитку згаданих серцево-судинних захворювань внаслідок присутності у нього атеросклеротичних бляшок.

Пацієнтом з ризиком розвитку серцево-судинного захворювання, пов'язаного з атеросклерозом, може виявитися той, хто має в крові високі рівні холестерину, які, імовірно, можуть викликати або загострювати серцево-судинне захворювання або дисфункцію.

Пацієнтом може бути той, хто має ризик розвитку коронарного серцевого захворювання через множинні фактори ризику (включаючи ожиріння, паління, гіпертонію, діабет і наявність у сімейній історії коронарної серцевої хвороби); той, хто має сімейні умови, що характеризуються дуже високими концентраціями холестерину та/або тригліцеридів у плазмі крові; той, у кого гіперліпідемія не є вторинною по відношенню до попередніх захворювань (таких як гіпотиреоз, нефротичний синдром, захворювання печінки або алкоголізм); той, у кого підвищений рівень холестерину в ЛПНГ; або той, хто одержує гіполіпідемічну дієту (додаткове лікування).

Крім того, відомо, що оскільки способи та застосування даного винаходу ведуть до зменшення розміру вже існуючих атеросклеротичних бляшок, даний винахід є особливо корисним для лікування пацієнтів із запущеним або важким атеросклерозом та із запущеними або важкими формами серцево-судинного захворювання, пов'язаними з атеросклерозом.

У втіленні, даний винахід може включати перший етап визначення розміру та/або довжини атеросклеротичних бляшок у хворого. Це може бути зроблене для оцінки того, чи потребує хворий терапії для зменшення скупчень атеросклеротичних бляшок, або для одержання базової лінії вимірів для оцінки ефективності подібної терапії, або з обома цілями.

Таким чином, можна вважати, що даний винахід включає спосіб ідентифікації пацієнта зі скупченнями атеросклеротичних бляшок, що потребує їх зменшення, і наступне введення хворому, щонайменше, одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, або, щонайменше, одного окисленого епітопа ЛПНГ.

Відомо, що відкладення атеросклеротичних бляшок, що потребують зменшення, можуть вимагати зменшення через розмір та/або поширеність сумарного скупчення бляшок. Додатково або як альтернатива, зменшення може бути необхідним внаслідок природи бляшок, наприклад, через їхню нестабільність.

Також можна вважати, що даний винахід включає застосування, щонайменше, одного антитіла, яке селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, або як у препараті медикаменту для індукції зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок у індивідуума, для якого була визначена необхідність такого лікування, шляхом вимірюван-

ня розміру та/або кількості та/або поширеності атеросклеротичних бляшок у індивідуума.

Не обов'язково та звичайно, даний винахід може також включати заключну стадію визначення розміру, та/або кількості, та/або поширеності атеросклеротичних бляшок у пацієнта після введення, щонайменше, одного антитіла, що селективно зв'язує окислений епітоп ЛПНГ, або, щонайменше, одного окисленого епітопа ЛПНГ, для того, щоб оцінити ефективність терапії в порівнянні з базовим виміром, проведеним до терапії.

Доза, щонайменше, одного антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, який вводиться пацієнтові, звичайно буде визначатися лікарем з урахуванням атеросклеротичного стану пацієнта, що буде проходити лікування, інших терапевтичних агентів, які будуть введені, віку, статі та розміру пацієнта і інших факторів. Однак, звичайно доза, щонайменше, одного окисленого епітопа ЛПНГ, що вводиться пацієнтові, буде визначатися лікарем на основі ваги тіла пацієнта, що проходить лікування.

Було доведено, що статини (інгібітори 3-гідрокси-3-метилглутарил-кофермент А (НМС-СоА)-редуктази) ефективно запобігають гострим серцево-судинним подіям шляхом зменшення вмісту холестерину в плазмі (і за допомогою інших механізмів, які тільки мають бути з'ясовані). Введення статину разом з описаною вище імунотерапією може виявитися доцільним способом терапії для посилення зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок. Краще вибираються два режими введення для надання взаємопосилюючого ефекту.

Тому в наступному аспекті винаходу представлений спосіб боротьби із серцево-судинним захворюванням, пов'язаним з атеросклерозом у особини, що потребує цього, який включає:

індукцію зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок у особини шляхом введення особині: (а) щонайменше, однієї молекули антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, або (b) щонайменше, одного окисленого епітопа ЛПНГ; і

введення особині статину.

У наступному аспекті винаходу представлено застосування (а) щонайменше, однієї молекули антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, або (b) щонайменше, одного окисленого епітопа ЛПНГ; у препараті лікарського засобу для боротьби із серцево-судинним захворюванням, пов'язаним з атеросклерозом, шляхом індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок, де індивідуум є тим, кому вводиться статин.

У зв'язаному аспекті винаходу представлено застосування статину в препараті лікарського засобу для боротьби із серцево-судинним захворюванням, пов'язаним з атеросклерозом, де хворому вводяться (а) щонайменше, одна молекула антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, або (b) щонайменше, один окислений епітоп ЛПНГ, для індукції зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок.

Ще один зв'язаний аспект даного винаходу представляє застосування: (а) щонайменше, однієї молекули антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, або (б) щонайменше, одного окисленого епітопа ЛПНГ і статину, у препараті лікарського засобу для боротьби із серцево-судинним захворюванням, пов'язаним з атеросклерозом, шляхом індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок.

Додатково надається фармацевтична композиція, яка включає: (а) щонайменше, одну молекулу антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, або (б) щонайменше, один окислений епітоп ЛПНГ і статин, у суміші з фармацевтично прийнятним ад'ювантом, розчинником або носієм.

У наступному аспекті даного винаходу надається набір, що включає такі компоненти:

(а) щонайменше, одну молекулу антитіла, яке селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, або (б) щонайменше, один окислений епітоп ЛПНГ і статин,

у якому кожен компонент представлений у формі, придатній для введення в сполученні з іншими.

У понятті "в сполученні" ми маємо на увазі те, що компоненти можуть бути придатними для одночасного або комбінованого введення пацієнту. Однак, оскільки може знадобитися введення компонентів різними способами або з різними швидкостями, у поняття "в сполученні" ми також включаємо поняття послідовного введення або роздільного введення в одному режимі терапії.

Придатні статини включають аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, правастатин, розувастатин і симвастатин.

У втіленні даного винаходу антитіло може бути приєднане до протизапальних агентів. Відповідні протизапальні агенти включають стероїдні сполуки, такі як дексаметазон, бетаметазон, преднізон, преднізолон, триамцинолон, гідрокортизон, алкометазон, амцинолід, дифлоразон і т.д., а також нестероїдні протизапальні агенти. Способи приєднання речовин, таких як перелічені вище протизапальні агенти, до антитіл, добре відомі в даній області техніки.

Наступний аспект даного винаходу надає спосіб ідентифікації антитіла, що індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у хворого, який включає:

надання антитіла, що селективно зв'язується з окисленим епітопом ЛПНГ, і

його тестування в аналізі зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок, де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок в аналізі вказує, що антитіло індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок.

Аналіз зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок може бути аналізом *in vivo*, як наприклад, у тваринних моделях, описаних у прикладах 2 або 4.

Краще, щоб тестоване антитіло було вибрано з бібліотеки фрагментів людських антитіл, як описано вище.

Також краще, щоб тестоване антитіло селективно зв'язувалося з окисленим, особливо MDA-модифікованим, пептидом, отриманим з ApoB-100.

Ідентифіковані фрагменти антитіл з бажаними характеристиками зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок потім, для застосування в терапевтичних цілях, можуть бути перебудовані на інші конфігурації антитіл, наприклад, повноланцюговий імуноглобулін людини.

Наступний аспект даного винаходу надає спосіб ідентифікації агента, що індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у хворого, який включає:

надання агента, що містить окислений епітоп ЛПНГ,

введення агента хворому, у якого є атеросклеротичні бляшки, і

визначення того, чи індукує даний агент зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок,

де зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок вказує, що агент індукує зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок.

Відомо, що особина може бути тваринною моделлю атеросклерозу, такою як описана в прикладі 2 або прикладі 4. Як альтернатива, спосіб може бути використаний в умовах клінічного випробування агента, у якому особиною може бути людина, у якій присутні атеросклеротичні бляшки.

Заключний аспект даного винаходу надає антитіло, що включає:

щонайменше, одну гіперваріабельну ділянку (CDR), що містить амінокислотну послідовність, яка відповідає CDR антитіла 2D03, зазначений в Таблиці 2, або,

щонайменше, одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, яка відповідає CDR антитіла LDO D4, зазначений в Таблиці 2.

Краще, щоб антитіло містило два, або три, або чотири, або п'ять CDR-ділянок, які мають послідовність відповідних CDR-ділянок антитіл 2D03 або LDO D4.

Якщо антитіло містить три або чотири CDR-ділянки, які мають відповідні CDR-ділянки антитіл 2D03 або LDO D4, краще, щоб антитіло мало всі три CDR-ділянки важких ланцюгів або всі три CDR-ділянки легких ланцюгів, які мають послідовність відповідних CDR-ділянок антитіл 2D03 або LDO D4.

Таким чином, даний аспект даного винаходу включає антитіло, що включає:

три CDR-ділянки легких ланцюгів, які мають послідовності відповідних трьох CDR-ділянок легких ланцюгів антитіла 2D03, або

три CDR-ділянки важких ланцюгів, які мають послідовності відповідних трьох CDR-ділянок важких ланцюгів антитіла 2D03, або

три CDR-ділянки легких ланцюгів, які мають послідовності відповідних трьох CDR-ділянок легких ланцюгів антитіла LDO D4, або

три CDR-ділянки важких ланцюгів, які мають послідовності відповідних трьох CDR-ділянок важких ланцюгів антитіла LDO D4

Ще краще, коли антитіло містить три CDR-ділянки легких ланцюгів і три CDR-ділянки важких ланцюгів, які мають послідовності відповідних

CDR-ділянок антитіла 2D03, або три CDR-ділянки легких ланцюгів і три CDR-ділянки важких ланцюгів, які мають послідовності відповідних CDR-ділянок антитіла LDO D4

Якщо антитіло не містить всі шість CDR-ділянок, які мають послідовності відповідних CDR-ділянок антитіла 2D03 або LDO D4, краще, якщо деякі або всі з 1, 2, 3, 4 або 5 "неідентичних" CDR-ділянок включали б варіанти послідовності відповідних CDR-ділянок антитіла 2D03 або LDO D4 У поняття "варіант" ми включаємо значення, за яким варіант має послідовність, щонайменше, на 50 % ідентичну послідовності відповідної CDR-ділянки, краще, щоб ідентичність становила, щонайменше, 70 %, ще краще, щонайменше, 80 % ідентичності, або щонайменше, 90 %, або, щонайменше, 95 % Краще, якщо варіант має послідовність, на 96 %, або 97 %, або 98 %, або 99 %, ідентичну послідовності відповідної CDR-ділянки антитіла 2D03 або LDO D4 Звичайно "варіант" послідовності CDR-ділянки має 5, або 4, або 3, або 2, або 1 амінокислотний залишок, що відрізняється від послідовності відповідної CDR-ділянки антитіла 2D03 або LDO D4.

Даний аспект винаходу включає антитіло 2D03 та антитіло LDO D4.

Даний винахід також включає антитіло, що селективно зв'язується з епітопом окисленого ЛПНГ, з яким селективно зв'язуються антитіло 2D03 або антитіло LDO D4. Способи визначення того, чи відбувається селективне зв'язування будь-якого даного антитіла з епітопом окисленого ЛПНГ, з яким селективно зв'язується антитіло 2D03 або антитіло LDO D4, добре відомі фахівцям в даній області техніки.

Даний винахід також включає фармацевтичну композицію, що включає антитіло, яке відповідає даному аспекту винаходу, і фармацевтично прийнятний носій антитіла, відповідно до даного аспекту даного винаходу для застосування в медицині, і застосування антитіла, що відповідає даному аспекту винаходу, у препараті лікарського засобу для індукування зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок.

Всі документи, на які є посилання в даному документі, у всій своїй повноті включені в даний документ у вигляді посилань.

Перелічення або обговорення раніше опублікованого документа в даному описі винаходу не повинні в обов'язковому порядку сприйматися як визнання того, що цей документ є частиною рівня техніки або є загальновідомим знанням.

Перелік фігур

Тепер даний винахід буде описаний більш детально за допомогою посилань на наступні Приклади та Фігури.

Фігура 1. Люмінесцентний ELISA-аналіз, що демонструє зв'язування антитіла 2D03 та IEI-E3 з окисленими та нативними формами ЛПНГ та Apo-B100. Префікс MDA означає модифіковані MDA форми ЛПНГ та Apo-B100, у той час як Na позначає нативні форми даних сутностей. Су-ЛПНГ означає окислені міддю ЛПНГ. Зв'язування детектувалося за допомогою кон'югованих з пероксида-

зою IgG до людських антитіла (RLU - відносні одиниці люмінесценції).

Фігура 2. Аналіз зв'язування (на основі ELISA) антитіла 2D03 та IEI-E3 з MDA-модифікованим людським Apo-B100. Контроль відповідає зв'язуванню антитіла FITC-8 з тим же антигеном. Спорідненість визначалася аналізом на Biacore.

Фігура 3. Зв'язування одноланцюгового фрагмента (scFv) антитіла IEI-E3 та 2D03 з рядом різних MDA-модифікованих антигенів. P2 (амінокислоти [ак] 16-31); P45 (ак 661-680); P129 (ак 1921-1940); P143 (ак 2131-2150); P210 (ак 3136-3155) і P301 (ак 4502-4521) є пептидами, що відповідають певним ділянкам послідовності людського Apo-B100. Контрольним пептидом був лізинсодержачий пептид, що не стосується Apo-B100 (MDA-модифікований, чорний). Дані представлені у вигляді сигнал/10⁵. Скорочення такі ж, як були вказані в тексті.

Фігура 4. Імуногістохімічне фарбування людських бляшок з антитілами 2D03, IEI-E3 і контрольним антитілом FITC-8. Зв'язане антитіло детектувалося за допомогою кон'югованого з пероксидазою хрому вторинного антитіла та фарбування діамінобензидином.

Фігура 5. Площа бляшок у низхідній аорті мишей ApoBec з атеросклерозом, які одержували терапію антитілами 2D03 та IEI-E3, LDO-D4 та KTT B8, специфічними до окислених ЛПНГ. Як контроль використовували антитіло відповідного ізо типу FITC-8. Площу бляшок оцінювали фарбуванням Oil Red O. Значення представлені як відсоток загальної площі бляшок від загальної площі низхідної аорти.

Фігура 6. Обробка людських макрофагів, похідних з моноцитів, IgG до окислених ЛПНГ блокує вивільнення MCP-100. Людські макрофаги, що походять з моноцитів, прекультивовані протягом 10 днів у присутності людської сироватки, протягом 4 днів оброблялися 60 мкг/мл клонами IgG1 до окислених ЛПНГ, негативним контролем IgG або тільки фізіологічним розчином, як зазначено. Супернатанти відокремлювали та аналізували на вміст MCP-100 за допомогою комерційно доступного ELISA. Дані представлені у вигляді середнього трьох значень, отриманих від чотирьох донорів, і стандартної помилки середнього.

Фігура 7. Ефект блокування MCP за допомогою IgG до окислених ЛПНГ на атерома-подібних макрофагах був швидким і стабільним у часі. Людські моноцити або людські макрофаги, що походять з моноцитів, були отримані від двох донорів (кружки та квадрати, відповідно). Клітини обробляли 60 мкг/мл антитіла 2D03 (зафарбовані символи) або контрольним антитілом (незафарбовані символи) або відразу (ліва частина графіка) або після прекультивування моноцитів протягом 14 днів у присутності людської сироватки (права частина графіка). Супернатанти відокремлювали та аналізували на вміст хемокіну MCP-1 CC за допомогою комерційно доступного ELISA. Дані представлені у вигляді середнього трьох значень і стандартної помилки середнього.

Здійснення винаходу

Приклад 1: Одержання людських антитіл з високою спорідненістю та специфічністю до епітопів, присутніх на окислених ЛПНГ.

Фрагменти людських антитіл, що специфічно зв'язують окислені ЛПНГ, були вибрані з бібліотеки n-CoDeR практично так, як описано (Schiopu et al., 2004). Коротко, бібліотеку експресували за допомогою методу фагового дисплея та відібрали для зв'язування із сумішшю біотинільованих окислених пептидів, отриманих з Apo-B100. Зв'язані фаги були відібрані за допомогою покритих авідином магнітних частинок 2-3 циклами відбору (Soderlind et al. (2000) *Nature BioTechno* 18: 852-856) і остаточно перевірені на зв'язування з MDA-модифікованими та окисленими Cu формами ЛПНГ та ApoB-100. Антитіла зв'язувалися з MDA-модифікованими та окисленими Cu формами ЛПНГ та ApoB-100, але не зв'язували їх нативні, неокислені форми (Фігура 1). Приклади зв'язування та спорідненості антитіл представлені на Фігурі 2, на якій зв'язування антитіла 2D03 порівнюється зі зв'язуванням антитіла IEI-E3. Порівняння специфічності зв'язування 2D03 та IEI-E3 виявило, що вони мають подібну, але не ідентичну специфічність до MDA-модифікованих форм пептидів, отриманих з ApoB-100, і 2D03 дає в аналізі більший сигнал (Фігура 3).

Як показано на Фігурі 4, за допомогою імуногістохімії було оцінено, що антитіла також специфічно зв'язуються з людськими атеросклеротичними бляшками, але не з нормальною тканиною.

Приклад 2: Зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок у тваринній моделі при застосуванні імунотерапії, основаної на пасивній імунізації.

Способи

Антитіла

Вибрані scFv з бажаними властивостями були перенесені у формат повнорозмірного людського антитіла IgG1 із застосуванням раніше описаних способів (Schiopu et al., 2004).

Миші, пасивна імунізація та препарати тканин

В даному дослідженні були використані самці мишей LDLR^{-/-} ApoBec на основі C57BL/6 з Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). З 4-тижневого віку мишей годували дієтою з високим вмістом холестерину (0,15 % холестерину, 21 % жиру, Lactamin AB, Kimstad, Sweden), яку надавали в необмеженій кількості. За один тиждень до першої імунізації дієта була змінена на нормальну їжу. У віці 25 тижнів одна група мишей була умертвлена як контроль рівня утворення бляшок на початку експерименту, а трьома групам, що залишилися, внутрішньочеревинно ін'єкували 1 мл на дозу людських антитіл IgG1, специфічних до MDA-модифікованих пептидів ApoB-100, або контрольне антитіло відповідно. Як контроль використовували неспецифічне людське антитіло IgG1 до флуоресцеїнізотіоціанату (FITC-8). Ін'єкції повторювали два рази з інтервалами в один тиждень.

У віці 29 тижнів мишей, анестезованих внутрішньочеревинним введенням 300 мкл розчину з дистильованої води, фентанілу/флуанізону та мідазоламу (2:1:1, об./об./об.), гуманно умертвили шляхом знекровлювання через пункцію серця. Після перфузії всього тіла фосфатно-сольовим

буфером, а потім Histochoice (Amresco, Solon, Ohio) серце вирізали та зберігали в Histochoice при 4 °C до обробки. Низхідна аорта була відділена від зовнішнього жиру та сполучних тканин, розрізана уздовж, закріплена en face просвітом угору на покритих яєчним альбуміном (Sigma, St.Louis, Missouri) предметних стеклах (так званий плоский препарат) (Branen et al., 2001). Місцевий Комітет з Біоетики схвалив експериментальний протокол, використаний в даному дослідженні.

Аналіз площі бляшок

Фарбування та кількісне визначення площі бляшок у плоских препаратах низхідної аорти було проведено, як описано раніше (Fredriksson et al., 2003). Площа бляшок була безпосередньо виміряна за допомогою мікроскопії та морфометрії із застосуванням комп'ютера (Image Pro Plus), і результати були виражені як середнє значення площі бляшок на зріз.

Статистичний аналіз

Дані представлені у вигляді середнього \pm стандартне відхилення. Аналіз даних був проведений із застосуванням двостороннього критерію Манна-Уїтні. Результати вважалися статистично значущими при рівні $< 0,05$.

Результати

В даному дослідженні проводили порівняння рекомбінантних людських антитіл IgG1, спрямованих проти окислених ЛПНГ. Раніше ми продемонстрували, що антитіло IEI-E3 ефективно інгібує ранній розвиток атеросклерозу у мишей ApoE^{-/-} (Schiopu et al., 2004). Як ізотипичний контроль було використано людське антитіло IgG1, спрямоване проти флуоресцеїнізотіоціанату, FITC-8, що не зв'язується з нативними або окисленими ЛПНГ.

Ефект антитіл на розвиток атеросклерозу був протестований на мишах LDLR^{-/-} ApoBec. Миші одержували три внутрішньочеревинні ін'єкції 1 мг антитіла в дозі у віці 25,26 та 27 тижнів, і були умертвлені через 2 тижні після останньої ін'єкції, у віці 29 тижнів. Терапія антитілами не впливала на загальний стан здоров'я мишей. Значні відмінності за вагою та рівнями в плазмі холестерину та триацилгліцеролу між досліджуваними та контрольними групами були відсутні (дані не наведені). Одна група тварин була умертвлена на початку дослідження для визначення базового рівня скупчення бляшок.

Ступінь атеросклерозу був виміряний на пофарбованих Oil Red O en face-препаратах грудної аорти та черевної аорти. Як показано на Фігурі 5, всі досліджені антитіла індукували значний зворотний розвиток скупчення бляшок у тварин, що одержували терапію, у порівнянні з контрольними антитілами та базовим значенням, отриманим на мишах у віці 25 тижнів. Антитіло 2D03 продемонструвало максимальний рівень зворотного розвитку з ефектом, рівним 51 % ($p=0,0003$), у порівнянні з антитілом FITC-8, і рівним 60 % ($p=0,003$), у порівнянні з базовим значенням. Інші антитіла також значно зменшували скупчення бляшок ($p<0,01$) у порівнянні з групою, що одержувала FITC-8, або з базовим значенням.

Обговорення

Дане дослідження продемонструвало, що терапія рекомбінантними людськими антитілами IgG1 проти епітопів окислених ЛПНГ на тваринній моделі значно зменшує скупчення атеросклеротичних бляшок у низхідній аорті. Схоже, що антитіло 2D03, яке зв'язується більш ефективно, чинить більш сильний ефект, ніж IE1-E3 та інші антитіла, але відмінності у площі бляшок в групах, що одержували антитіла, були недостовірними. Цей результат уперше демонструє, що антитіла, які зв'язуються з окисленими формами ЛПНГ, мають здатність індукувати зворотний розвиток атеросклеротичних бляшок.

Антитіла, виявлені в плазмі у людей і спрямовані проти окислених ЛПНГ, були асоційовані із тривалістю хвороби, прогресуванням та ступенем активності в багатьох дослідженнях (Tsimikas et al., 2001, Salonen et al., 1992, Maggi et al., 1993). Титри подібних антитіл у майбутньому можуть бути корисні як маркери для детектування присутності нестабільних бляшок у пацієнтів із серцевосудинними захворюваннями (Nilsson and Fredriksson, 2004, Nilsson and Kovanen, 2004).

Пацієнти з високим ступенем ризику виникнення інфаркту міокарда та інсульту мають потребу в негайній, швидкодіючій та ефективній терапії. Статини (інгібітори HMG-CoA) є ефективними у запобіганні гострих серцево-судинних захворювань за рахунок зменшення вмісту холестерину в плазмі та додаткових механізмів, які ще повинні бути з'ясовані. Були початі безперервні спроби розробити нові засоби терапії, які, не замінюючи статинів, додали б свою дію при використанні інших, доповнювальних механізмів.

Тому пряма безпосередня ефективна терапія антитілами могла б стати рішенням для пацієнтів у групі ризику, які близькі до небезпечного для життя цереброваскулярного або серцевого епізоду. В даному дослідженні ми показали, що при переведенні мишей з дієти західного типу до нормального харчування з наступним введенням трьох доз антитіл, виразність атеросклерозу зменшилася на 50 % протягом 4-х тижневого періоду. Як зазначено вище, на момент початку терапії у мишей вже спостерігався комплекс атеросклеротичних бляшок.

Терапія антитілами у людини може виявитися навіть більш ефективною, ніж у мишей. Антитіла, які ми використовували, були людськими антитілами IgG1, отриманими проти людських окислених ЛПНГ ApoB-100. Гомологія між людським і мишачим ApoB-100 не абсолютна, що погіршує у певній мірі зв'язування людських антитіл з мишачими окисленими ЛПНГ. Імунна система мишей реагує на чужорідні людські антитіла, утворюючи мишачі антитіла до людських IgG1, що негативно корелює з кількістю введених антитіл, які усе ще присутні в плазмі на момент евтаназії, як було продемонстровано нами раніше (Schiopu et al., 2004). Дані антитіла можуть зменшувати ефективність терапії у мишей людськими антитілами IgG1 шляхом блокування їх сайтів зв'язування або індукуючи їх виведення із кровотоку.

Приклад 3: Модуляція запальної активності макрофагів антитілами проти окислених епітопів ЛПНГ

Молекулярні механізми, що лежать в основі ефектів захисту від атеросклерозу за допомогою терапії антитілами до окисленого ApoB-100 (oxApoB-100) охарактеризовані не повністю. Однак, роль макрофагів у розвитку та гомеостазі бляшок (Li and Glass, 2002), і спостереження, що терапія антитілами проти oxApoB-100 зменшує вміст макрофагів у бляшках *in vivo* (Schiopu et al., 2004), вказує на механізми, які регулюють рекрутинг та функціонування макрофагів. Метаболічний шлях MCP-1, утворений MCP-1 та його рецептором CCR2, є найбільш важливим хемотаксичним регулятором інфільтрації та міграції моноцитів і макрофагів, і на різних рівнях залучений в атерогенний процес (Chargo and Taubman, 2004). Тому ми досліджували ймовірність того, що ефекти захисту від атеросклерозу IgG проти oxApoB-100 включають інтерференцію сигнального шляху MCP-1.

При обробці людських макрофагів, що походять з моноцитів, IgG проти oxApoB-100 було виявлено зменшення вивільнення MCP-1 аж до 60 % у порівнянні із клітинами, обробленими контрольним IgG (Фігура 6). Інгібіторний ефект можна було відтитрувати, максимальні ефекти спостерігалися від 30 до 60 мкг/мл. Ефект блокування MCP-1 антитілами проти oxApoB-100 на зрілих макрофагах був швидким і стабільним у часі (Фігура 7). Концентрації MCP-1 у супернатантах, ізольованих через 24, 48, 72 або 96 годин після інкубації з IgG проти oxApoB-100, залишалися постійними на низькому рівні. Навпроти, при обробці контрольним IgG спостерігалася рівномірне збільшення концентрації MCP-1 у часі. Ефект блокування MCP-1 був навіть яскравіше виражений, коли антитіла інкубували зі свіжовиділеними моноцитами (Фігура 7). В результаті обробки моноцитів IgG проти oxApoB-100 протягом 48 годин спостерігалася різноманітне зменшення в 60 разів концентрацій MCP-1 у порівнянні із клітинами, обробленими контрольним IgG.

Також було виявлено, що обробка IgG проти oxApoB-100 регулює синтез MCP-1 на транскрипційному рівні. Свіжовиділені моноцити інкубували з IgG проти oxApoB-100 або з контрольним IgG протягом двох днів. Клітини були зібрані та була виділена мРНК, кількість якої була визначена за допомогою ПЛР у реальному часі. Експресія генів була пов'язана з 18S РНК. Клітини моноцитів, інкубовані з IgG проти oxApoB-100 протягом двох днів, продемонстрували 80 % зменшення рівня мРНК MCP-1 у порівнянні із клітинами, обробленими контрольним IgG (дані не наведені).

Ефект блокування MCP-1 IgG проти oxApoB-100 не був наслідком загального цитотоксичного ефекту. Макрофаги, зібрані після обробки IgG проти oxApoB-100, були повністю життєздатними, як було визначено фарбуванням трипановим синім і наступним аналізом за допомогою світлового мікроскопа.

Наші результати означають, що захисні ефекти проти атеросклерозу, які чинять антитіла проти oxApoB-100, включають інгібіторний вплив на вивільнення MCP-1 у моноцитах і макрофагах. У ре-

крутингу моноцитів і макрофагів, а також у їхній міграції у здоровому стані та під час хвороби МСР-1 є основним чинником. Особливо, делеція потрійного СС-хемокіну моноцитів/макрофагів МСР-1 (Gu et al., 1998) або його відповідного рецептора CCR2 (Boring et al., 1998) захищає мишей від атеросклерозу *in vivo*. При стимуляції моноцитів МСР-1 *in vitro* була показана стимуляція трансендотеліальної міграції моноцитів, а в присутності охЛПНГ була показана стимуляція макрофагів до трансформції в піністі клітини (Tangirala et al., 1997). Не бажаючи бути зв'язаними теорією, ми припустили, що обробка антитілами проти охАроВ-100 може забезпечувати селективне інгібування вивільнення МСР-1, таким чином, зводячи до мінімуму потенційні побічні ефекти інгібування міграції моноцитів до місць запалення, не пов'язаних з атеросклеротичними бляшками.

Приклад 4: Індукція зворотного розвитку атеросклеротичних бляшок у тваринній моделі із застосуванням імунотерапії, основаної на активній імунізації

Раніше було продемонстровано, що імунізація охЛПНГ (Palinski et al., 1995, Ameli et al., 1996, Freigang et al., 1998, Zhou et al., 2001, Nilsson et al., 1997) або пептидами АроВ-100 (Fredriksson et al., 2003) ефективна у мишей, і зараз дослідження зі створення вакцини проти атеросклерозу знаходяться у процесі розробки (Nilsson et al., 2004; Hansson et al., 2002; Sherer & Shoenfeld, 2002; Zhou & Hansson, 2004).

Для того, щоб дослідити можливість вакцинації проти пептидів, отриманих з окисленого АроВ-100 для зменшення розмірів атеросклеротичних бляшок, мишей LDLR^{-/-} АроВес годували дієтою з високим вмістом жирів протягом 21 тижня, починаючи з 4-х тижневого віку. Коли миші досягали 25 тижневого віку, одну групу тварин умертвляли та визначали ступінь атеросклерозу в низхідних аортах. Дана група слугувала як група базового рівня, з яким порівнювали ступінь атеросклерозу в інших групах. Досліджуваних тварин, яких вакцинували пептидами або тільки фосфатно-сольовим буфером, зняли з дієти з високим вмістом жирів, і робили їм ін'єкції протягом декількох тижнів, після чого тварин умертвили та визначали ступінь атеросклерозу.

Вище, у Прикладі 2, ми продемонстрували, що ступінь скупчення бляшок зберігає стабільність протягом 4-х тижневого періоду з 25 до 29 тижня, коли тварини зняті з дієти з високим вмістом жирів. Аналіз показав, що у тварин в групі базового рівня у віці 25 тижнів 10 % від площі низхідної аорти покриті бляшками. Було продемонстровано, що у вакцинованих тварин скупчення бляшок зменшене у порівнянні з контрольною групою та групою базового рівня. Це демонструє, що імунізація проти епітопів, виявлених в окислених формах ЛПНГ, може приводити до зменшення скупчення вже існуючих бляшок, і свідчить про те, що вакцинація може бути ефективним способом зменшення скупчення бляшок у пацієнтів.

Посилання

1. Ameli S., et al. (1996) Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early

atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 Aug; 16(8): 1074-9.

2. Boring, L., et al. (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-7.

3. Branen, L., et al., A procedure for obtaining whole mount mouse aortas that allows atherosclerotic lesions to be quantified. *Histochem J*, 2001. 33: p. 227-229.

4. Garr A.C., McCall M.R., Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Jul; 20(7): 1716-23.

5. Charo, I.F. and Taubman M.B. (2004) Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 95(9): 858-66.

6. Esterbauer H., Sehaeur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991; 11(1): 81-128.

7. Fredrikson G.N., et al., Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunisation with ApoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23: p. 879-884.

8. Freigang S., et al. (1998) Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 Dec; 18(12): 1972-82

9. Friedman P., et al. (2002) Correlation of antiphospholipid antibody recognition with the structure of synthetic oxidized phospholipids, Importance of Schiff base formation and aldol concentration, *J. Biol Chem*. 2002 Mar 1-277(9): 7010-20.

10. George, J., et al., "Hyperimmunisation of apoE-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis*, 1998. 138(1): p. 147-52.

11. Gu, L., et al. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2, 275-81.

12. Hansson, G.K., Vaccination against atherosclerosis: science or fiction? *Circulation*, 2002. 106 (13): p. 1599-601.

13. Heery J.M., et al. (1995) Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1995 Nov; 96(5): 2322-30.

14. Li, A.C. and Glass, C.K. (2002) The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 8, 1235-42.

15. Leitinger N, et al. (1999) Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 2. Potential involvement of biologically active oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 May; 19(5): 1291-8.

16. Maggi, E., et al., Specificity of autoantibodies against oxidised LDL as an additional marker for atherosclerotic risk. *Coron Artery Dis*, 1993. 4(12): p. 1119-22.

17. McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Prescott S.M. Biologically active oxidized phospholipids. *J Biol Chem*. 1999 Sep 3; 274(36): 25189-92.

18. Meziere C, (1997) In vivo T helper cell response to retro-inverso peptidomimetics. *J Immunol*.1997 Oct 1; 159(7): 3230-7.

19. Nicoletti A., et al. (1998). Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apo E knockout mice. *J Clin Invest*.1998 Sep 1; 102(5):910-8.

20. Nilsson J, et al. (1997) Immunization with homologous oxidized low density lipoprotein reduces neointimal formation after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *J Am Coll Cardiol* 1997 Dec; 30(7): 1886-91.

21. Nilsson, J. and G.N. Fredrikson, Atherosclerosis. Autoimmunity, 2004. 37(4): p. 351-5.

22. Nilsson, J. and P.X. Kovanen. Will autoantibodies help to determine severity and progression of atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 2004.15(5): p. 499-503.

23. Nilsson, J., G.K. Hansson, and P.K. Shah, Immunomodulation of Atherosclerosis. Implications for Vaccine Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004.

24. Nissen S.E., et al. (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial *JAMA*. 2003 Nov 5; 290(17): 2292-300.

25. Palinski W, et al. (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*.1989 Feb; 86(4): 1372-6

26. Palinski,W., E. Miller, and L.L. Witztum, Immunisation of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995. 92(3): p.821-5.

27. Salonen, LT., et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, 1992. 339 (8798): p. 883-7.

28. Schiopu A., et al. (2004) Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Oct 5; 110(14): 2047-52.

29. Shah P.K., et al. (1998). Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 1998 Mar 3; 97(8): 780-5.

30. Sherer, Y. and Y.Shoenfeld. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmun Rev*, 2002. 1(1-2): p.21-7.

31. Smiley P.L, et al. (1991) Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. *J Biol Chem*. 1991 Jun15; 266(17): 11104-10.

32. Smith J., et al. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl Acad Sci USA* Vol.92, pp.8264-8268, August 1995.

33. Tangirala R.K., Murao K., Quehenberger O. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines.*J Biol Chem*.1997 Mar 21; 272(12): 8050-6.

34. Tsimikas S., Shortal B.P.; Witztum J.L., Palinski W. In vivo uptake of radiolabeled MDA2,an oxidation-specific monoclonal antibody; provides an accurate measure of atherosclerotic lesions rich in oxidized LDL and is highly sensitive to their regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Mar; 20(3): 689-97.

35. Tsimikas, S., V.V. Palinski, and J.L. Witztum, Circulating autoantibodies to oxidised LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidised LDL in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(1): p.95-100.

36.Watson A.D., et al. (1999). Structural identification of a novel proinflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein.*J Biol Chem*.1999Aug27;274(35): 24787-98.

37. Witztum J.L., Berliner J.A. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1998 Oct; 9(5): 441-8.

38. Yang C, et al. (2001) Selective oxidation in vitro by myeloperoxidase of the N-terminal amine in apolipoprotein B-100. *J Lipid Res*. 2001 Nov; 42(11): 1891-6.

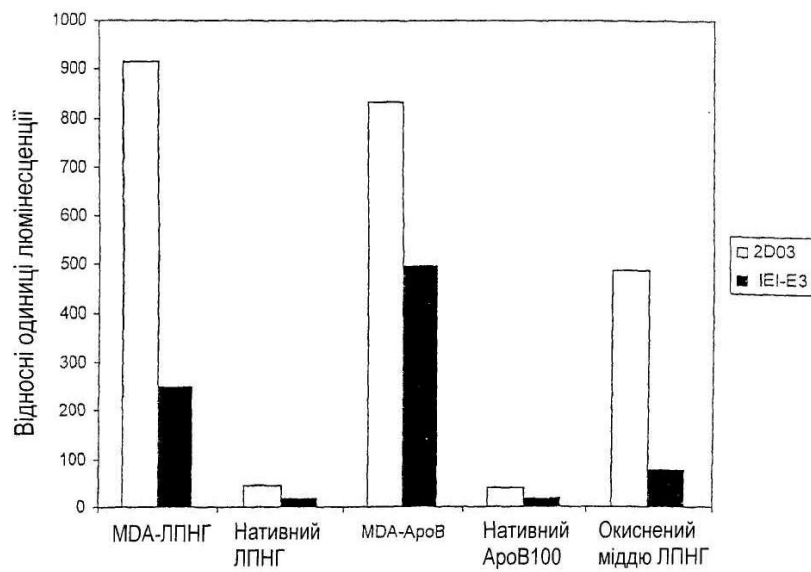
39. Zhou X., et al. (2001) LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Jan; 21(1): 108-14.

40. Zhou, X. and G.K. Hansson, Immunomodulation and vaccination for atherosclerosis. *Expert Opin Biol Ther*, 2004. 4(4): p.599-612.

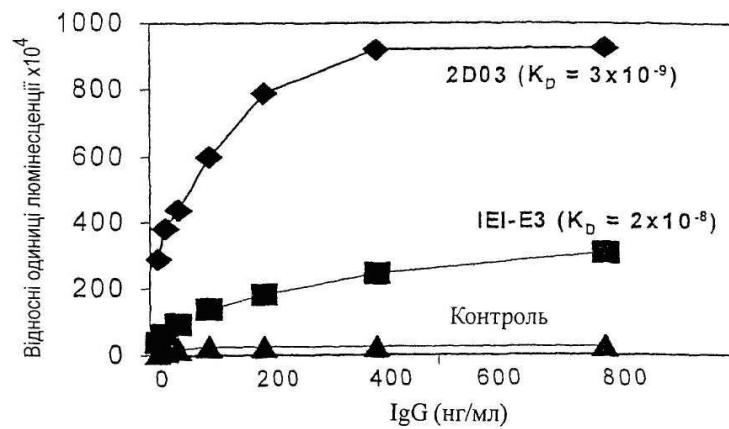
41. Sharif F., et al. (2004) "Current status of catheter-and stent-based gene therapy." *Cardiovasc Res*.64(2): 208-16.

42.Svensson E.C., et al. (1999) Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors.*Circulation*.99: 201-5.

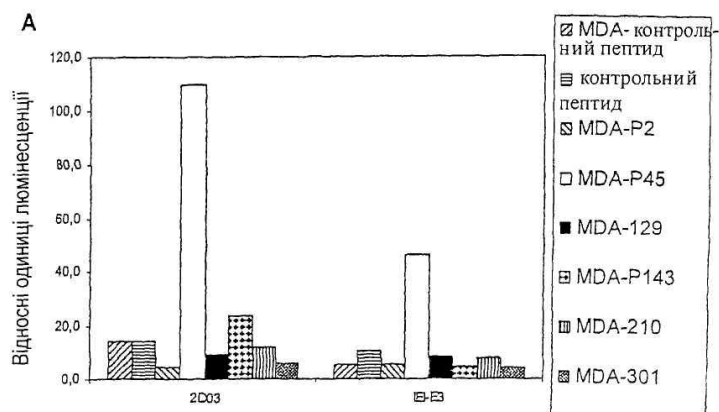
43.Melo L.G. et al., (2004) Gene and cell-based therapies for heart disease. *FASEB J*.18(6): 648-63.



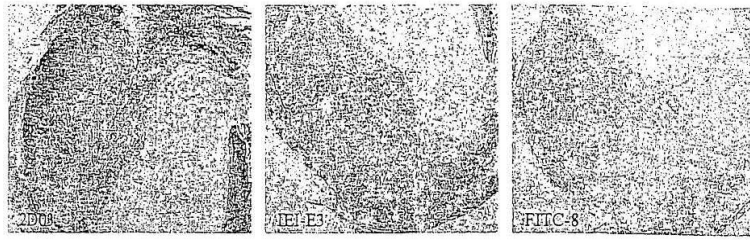
Фиг.1



Фиг.2

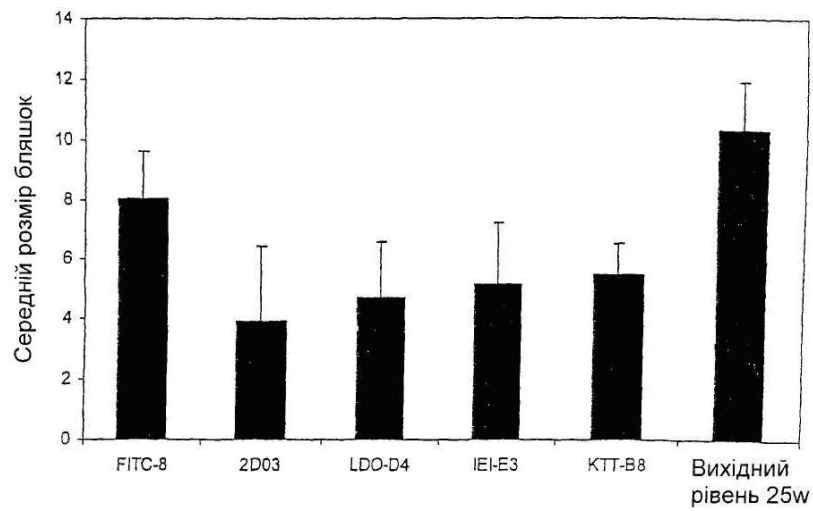


Фиг.3

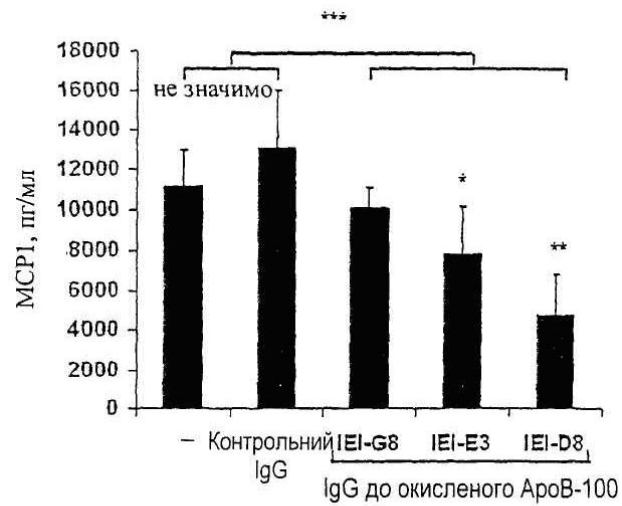


Фиг.4

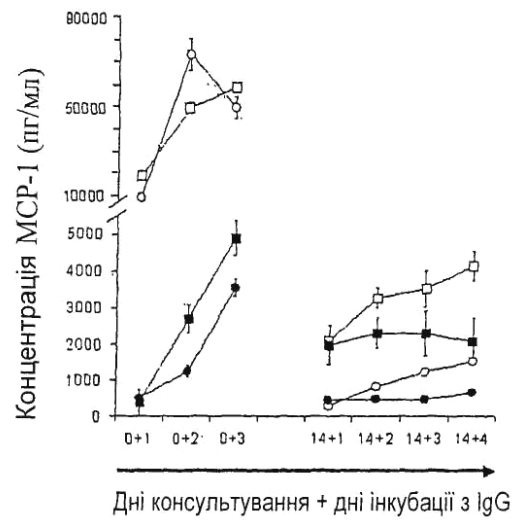
Зворотний розвиток бляшок



Фиг.5



Фиг.6



Фіг.7